



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

DIFERENTES MÉTODOS DE CULTIVO DE *Borrelia* spp. Y PRUEBAS DIAGNÓSTICAS VALIDADAS Y NO VALIDADAS DE BORRELIOSIS DE LYME.

Autor/es

YENIFER OLIVO MARTÍNEZ

Director/es

ARÁNZAZU PORTILLO BARRIO y JOSE ANTONIO OTEO REVUELTA

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2019-20



***DIFERENTES MÉTODOS DE CULTIVO DE *Borrelia* spp. Y PRUEBAS
DIAGNÓSTICAS VALIDADAS Y NO VALIDADAS DE BORRELIOSIS DE LYME.,***
de YENIFER OLIVO MARTÍNEZ

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

**DIFERENTES MÉTODOS DE CULTIVO DE *Borrelia* spp. Y PRUEBAS
DIAGNÓSTICAS VALIDADAS Y NO VALIDADAS DE BORRELIOSIS DE
LYME.**

Autora:

YENIFER OLIVO MARTÍNEZ

Tutores:

ARÁNZAZU PORTILLO BARRIO

JOSE ANTONIO OTEO REVUELTA

MÁSTER:

QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

Escuela de Máster y Doctorado



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

**AÑO ACADÉMICO:2019/2020
Logroño, España**

Tabla de contenido

Lista de Tablas.....	4
Lista de Figuras.....	5
Lista de Abreviaturas.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Agente Etiológico de la Borreliosis de Lyme	11
1.1.1 Aspectos Biológicos de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	11
1.1.2 Ciclo Biológico de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	16
1.2 Epidemiología de Borreliosis de Lyme.....	19
1.3 Manifestaciones clínicas de Borreliosis de Lyme	20
1.3.1 Enfermedad Temprana Localizada (etapa 1).....	22
1.3.2 Enfermedad Temprana Diseminada (etapa 2).....	22
1.3.3 Enfermedad Diseminada Tardía (etapa 3).....	24
1.3.4 Síndrome post-Lyme (PLDS) o síndrome de la enfermedad de Lyme posterior al tratamiento (PTLDS).	25
1.4 Diagnóstico de Borreliosis de Lyme.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
3. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 Estrategia de búsqueda	29
3.2 Selección de estudios	29
4. CULTIVO Y AISLAMIENTO DE <i>Borrelia</i> spp.	31
5. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS VALIDADAS.....	35
5.1 Diagnóstico Serológico.....	35
5.1.1 Enzimo-inmunoensayo (ELISA)	36
5.1.2 Inmofluorescencia indirecta (IFA) y otras técnicas de primer nivel	37
5.1.3 Western blot o Inmunoblot	38
5.1.4 Determinación de C6.....	41
5.2 Limitaciones del Diagnóstico Serológico	42
5.2.2 Valor predictivo de las pruebas	42
5.2.3 Reacciones cruzadas.....	43
5.2.4 Periodo de ventana seronegativa	44
5.2.5 Seropositividad y Reinfeción.....	44
6. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS NO VALIDADAS.....	45
6.1 Pruebas de evaluación de la respuesta inflamatoria y autoinmune	46
6.1.1 CXCL-13.....	46
6.1.2 CCL-19	47
6.1.3 Apolipoproteína B-100.....	48
6.2 Pruebas de evaluación de Inmunidad Celular.....	49
6.2.1 Pruebas de transformación de linfocitos (LTT)	49
6.2.2 IFN- γ ELISpot	50
6.2.3 Interferón alfa (IFN- α)	52

6.2.4	Recuento de células CD57 ⁺ NK	52
6.3	Pruebas Microbiológicas Directas	53
6.3.1	Xenodiagnóstico	53
6.3.2	Microscopía	55
6.3.3	Detección de proteínas de membrana OspA	56
6.4	Técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
6.4.1	Genes diana para la detección de <i>B. burgdorferi</i> s.l.	58
6.4.2	Ventajas y limitaciones.....	59
7.	CONCLUSIONES.....	61
8.	BIBLIOGRAFÍA	64

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Borrelia burgdorferi* sensu lato..... 12

Tabla 2. Listado de las genopecies de *B. burgdorferi* sensu lato. 12

Lista de Figuras

Figura 1. Morfología y arquitectura celular de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	15
Figura 2. <i>Ixodes ricinus</i>	17
Figura 3. Ciclo de transmisión y mantenimiento de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. en garrapatas.....	17
Figura 4. Distribución de garrapatas <i>Ixodes</i> que transmiten <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. a humanos.....	18
Figura 5. Etapas y características clínicas más comunes de la Borreliosis de Lyme.....	21
Figura 6. Manifestaciones dermatológicas de la borreliosis de Lyme.....	24
Figura 7. Lesiones clásicas de eritema migratorio.	24
Figura 8. Prueba confirmatoria para la detección de anticuerpos IgM frente a <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato (EUROIMMUN AG, Alemania).	40
Figura 9. Flujo de trabajo del ensayo ELISpot.	51

Lista de Abreviaturas

- Ac: Anticuerpos
- Ag: Antígenos
- ACA: Acrodermatitis crónica atrófica
- *B. burgdorferi* s.l.: *Borrelia burgdorferi* sensu lato
- BAR: Borrelias asociadas con reptiles
- BSK: Barbour-Stoenner-Kelly
- BSK-H: Barbour-Stoenner-Kelly Modificado
- CDC: Centro de Control y Prevención de Enfermedades (EE.UU.)
- EM: Eritema Migrans
- *I. ricinus*: *Ixodes ricinus*
- IFI: Inmufluorescencia Indirecta
- LCR: Líquido Cefalorraquídeo
- BL: Borreliosis de Lyme
- LTT: Prueba de transformación de linfocitos
- LCR: Líquido cefalorraquídeo
- MKP: Medio de cultivo Kelly Pettenkofer
- Osp: Proteína de superficie externa
- ELISA: Enzaimunanoanálisis
- SNC: Sistema nervioso central
- PLDS: Síndrome post-Lyme
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- VlsE: Sistema de variación antigénica

RESUMEN

La Borreliosis de Lyme (BL) es la enfermedad transmitida por garrapatas de mayor prevalencia en Europa. Su incidencia es variable y se estiman 255.000 casos/anuales. Es causada por espiroquetas del complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, principalmente por *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* y *B. garinii*, las cuales son transmitidas por garrapatas del género *Ixodes*. Generan una variedad de afecciones en las que destaca el eritema migratorio, la neuroborreliosis, artritis de Lyme y acrodermatitis crónica atrófica.

El diagnóstico de la BL se basa en la manifestación de síntomas compatibles con infección por *B. burgdorferi* s.l. aunados a las pruebas realizadas por los laboratorios clínicos. El cultivo no es empleado de forma rutinaria, aunque presenta buen rendimiento en muestras de biopsia procedentes de EM. Las recomendaciones actuales para el serodiagnóstico de la BL consisten en un enfoque de dos pruebas, un ensayo ELISA, seguido de una inmunotransferencia cuando los resultados son indeterminados o positivos. El diagnóstico de la infección se ve obstaculizado por una variedad de problemas: Así, las personas no enfermas pueden tener inmunidad (serología positiva en ELISA y WB), ya que un alto porcentaje de las personas que habitan en zonas endémicas tiene anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l.; existen personas infectadas que pueden tener un retraso en su respuesta inmune y dar un resultado negativo; existen numerosas reacciones cruzadas y las pruebas diagnósticas no están bien estandarizadas.

En Europa existen una variedad de ensayos disponibles que no se someten a ninguna forma de evaluación clínica obligatoria, no son validadas, presentan diversos datos de rendimiento y funcionan de forma distinta para las diversas manifestaciones de la enfermedad. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar las técnicas microbiológicas serológicas recomendadas y evaluar la utilidad de técnicas no estandarizadas, teniendo en cuenta la disponibilidad de muestras biológicas de calidad asociadas a parámetros clínicos confiables.

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión bibliográfica de los diferentes medios de cultivo utilizados para el aislamiento de *Borrelia* spp. y del valor de las pruebas microbiológicas (validadas y no validadas) para el diagnóstico de la BL.

Palabras Claves: Borreliosis de Lyme, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Inmunoensayo, Medio de cultivo, Diagnóstico, Detección molecular, Técnicas no validadas.

DIFFERENT METHODS OF CULTURE OF *Borrelia* spp. AND VALIDATED AND NON-VALIDATED DIAGNOSTIC TESTS FOR LYME DISEASE.

ABSTRACT

Lyme borreliosis (LB), is a tick-borne disease, most common in Europe. Its incidence is variable and is estimated at 255.000 cases/years. It is caused by spirochetes from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) species complex, mainly by *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii* and transmitted by hard ticks of the genus *Ixodes*. It may cause a wide range of clinical conditions, mainly erythema migrans, neuroborreliosis, Lyme arthritis, and acrodermatitis chronica atrophicans.

The diagnosis of LB is usually based on the presence of symptoms and signs of the infection by *B. burgdorferi* s.l., coupled with laboratory test results. Culture has not been used in routine clinical practice as a diagnostic test. Although it presents a good performance in biopsy samples of an EM skin lesion. Current recommendations for BL serodiagnosis consist of a two-tier testing algorithm, of a first-tier assay as ELISA, followed by immunoblotting when results are indeterminate or positive ELISA. The serodiagnosis has been hampered by several problems: Thus, non-sick people can have immunity (positive serology in ELISA and WB), since a high percentage of people living in endemic areas have antibodies against *B. burgdorferi* s.l.; some infected people may have a delay in their immune response and give a negative result; there are numerous cross-reactions and diagnostic tests are not well standardized.

In Europe, there is a variety of laboratory tests are not validated they present various accuracy data and work differently for the various manifestations of the disease. Hence, there is a need to improve the recommended serological microbiological techniques and evaluate the usefulness of non-standard techniques, taking into account the availability of quality biological samples associated with reliable clinical parameters.

The objective of this work was to carry out a bibliographic review of the different culture media used for the isolation of *Borrelia* spp. and the value of microbiological tests (validated and non-validated) for the diagnosis of LB.

Keywords: *Lyme borreliosis, Borrelia burgdorferi sensu lato, Immunoassay, Culture, Diagnostic, Molecular detection, No validated tests.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Agente Etiológico de la Borreliosis de Lyme

1.1.1 Aspectos Biológicos de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Borrelia spp. son un género de bacterias perteneciente al filo Spirochaetes (espiroquetas) dentro del orden Spirochaetales, familia Spirochaetaceae (**Tabla 1**). Se divide filogenéticamente en tres clados principales: el grupo de los agentes causales de borreliosis de Lyme (BL) (*Borrelia burgdorferi* sensu lato), el grupo que incluye los agentes causales de la fiebre recurrente (*Borrelia recurrentis*, *Borrelia hispanica* o *Borrelia miyamotoi*, entre otras) y el clado que comprende borrelias asociadas con reptiles (BAR) (*Borrelia turcica*) (Escudero et al., 2005; Becker et al., 2018).

En esta revisión nos centraremos en *Borrelia burgdorferi* s.l. (*B. burgdorferi* en sentido amplio) por ser el agente causal de la BL, la enfermedad transmitida por garrapatas duras (ixódidos) más prevalente en todo el mundo y un problema de salud pública mundial. *B. burgdorferi* s.l. presenta actualmente al menos 20 genoespecies identificadas que se transmiten por garrapatas del género *Ixodes*. En Europa, las genoespecies *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto y *Borrelia bavariensis* (estrechamente relacionada con *B. garinii*) son los agentes confirmados de la BL. Además, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia valaisiana* y *Borrelia lusitaneae* se han identificado como patógenos humanos en casos aislados (Escudero et al., 2000; Marques et al., 2010; G. Stanek et al., 2011; González et al., 2013). En España, se ha aislado *B. garinii* a partir de muestras clínicas de pacientes (Oteo et al., 1998). En Estados Unidos, *B. burgdorferi* s.s. es la especie mayoritaria causante de BL. Además, *Borrelia americana*, *Borrelia andersonii* y *B. bissettii* se han detectado en casos aislados en muestras humanas, y recientemente, *Borrelia mayonii* se ha descrito como una nueva genoespecie causante de BL (**Tabla 2**) (Stanek & Strle, 2018).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

REINO	Bacteria
FILO	Spirochaetes
CLASE	Spirochaetia
ORDEN	Spirochaetales
FAMILIA	Borreliaceae
GENERO	<i>Borrelia</i> *
ESPECIE	<i>B. burgdorferi</i> s.l

*Adaptado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=139>

Tabla 2. Listado de las genopecies de *B. burgdorferi* sensu lato.

Genoespecies	Localización geográfica
<i>B. afzelii</i> *	Europa
<i>B. americana</i>	Estados Unidos
<i>B. andersonii</i>	Estados Unidos
<i>B. bavariensis</i> *	Europa
<i>B. bissettii</i>	Europa, Estados Unidos
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto*	Europa, Estados Unidos
<i>B. californiensis</i>	Estados Unidos
<i>B. finlandensis</i>	Europa
<i>B. carolinensis</i>	Estados Unidos
<i>B. garinii</i> *	Europa, Asia
<i>B. kurtenbachii</i>	Estados Unidos
<i>B. lusitaniae</i>	Europa
<i>B. mayonii</i>	Estados Unidos
<i>B. japonica</i>	Japón
<i>B. tanukii</i>	Japón
<i>B. sinica</i>	China
<i>B. spielmanii</i> *	Europa
<i>B. turdi</i>	Europa, Japón
<i>B. yangtze</i>	China
<i>B. valaisiana</i>	Europa, Asia

*Patógenos humanos reconocidos. Adaptado de: (Mennelli et al.,2012)

Estas bacterias se caracterizan por ser espiroquetas Gram negativas, microaerófilas, trofoespecíficas, no productoras de toxinas, con una longitud de 3 a 30 μm y 0,2 a 0,5 μm de ancho y una temperatura óptima de crecimiento entre 34 a 37°C (Meléndez et al., 2014). Como todas las espiroquetas, son helicoidales, largas, delgadas, con cilindro protoplasmático formado por una membrana interna y una membrana externa ricas en lipoproteínas, con pared celular formada por peptidoglicano y flagelos periplásmicos que se encuentran anclados en los extremos de la membrana interna y se organizan formando haces que rodean helicoidalmente el cilindro protoplasmático (Escudero et al., 2005; Portillo et al., 2014).

Su genoma es relativamente pequeño, formado por un cromosoma lineal de aproximadamente 1 Mb con 9 plásmidos circulares y 12 lineales con un tamaño combinado de más de 533.000 pares de bases. Se sabe que los genes en estos plásmidos desempeñan papeles esenciales en la virulencia y la patogenicidad, así como en las asociaciones de huésped y vector (Casjens et al., 2017). Estructuralmente *B. burgdorferi* también contiene numerosas lipoproteínas de membrana, incluyendo las proteínas de superficie externa: OspA (30-32 kD), OspB (34-36 kD), OspC (22-25 kD), OspD (28- 30 kD), OspE (19 kD), y OspF (26 kD). Cabe resaltar que la lipoproteína OspA se expresa únicamente en aislados procedentes de garrapatas, antes de la alimentación hemática, OspC lo hace durante el proceso de transferencia desde el vector invertebrado al mamífero hospedador y está presente en la mayoría de las cepas europeas y no en las cepas norteamericanas (Rudenko et al., 2011a). La secuenciación de especies de *Borrelia* ha permitido conocer elementos importantes en la patogenicidad, como el locus *Vls* ubicado en el plásmido lp28 de *B. burgdorferi* MM1 que exhibe una variación activa de sus epítomos de superficie (Jabbari et al., 2018; Rogovskyy & Bankhead, 2013). Así mismo, existen otros polipéptidos adicionales que incluyen el flagelar (41 kD), proteínas de 60, 66, 73 kD, y un antígeno que es parte del protoplasma cilíndrico (93 kD) (Figura 1) (Steere et al., 2016)

Tienen una copia simple del gen de la subunidad ARNr 16S (*rrs*) y dos copias repetidas en tándem de los genes que codifican para las subunidades 23S (*rrl*) y 5S (*rrf*) del ARNr. Cabe anotar que son consideradas parásitos obligados por su capacidad metabólica limitada para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos y cofactores enzimáticos, que las hacen depender de su vector (garrapatas) y del huésped vertebrado (Boyle et al., 2020; González, 2013a; Krupka et al., 2007). Por ejemplo, *B. burgdorferi* carece de genes que codifican proteínas de interés en el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, y se basa exclusivamente en la glucólisis para la producción de energía (Steere et al., 2016).

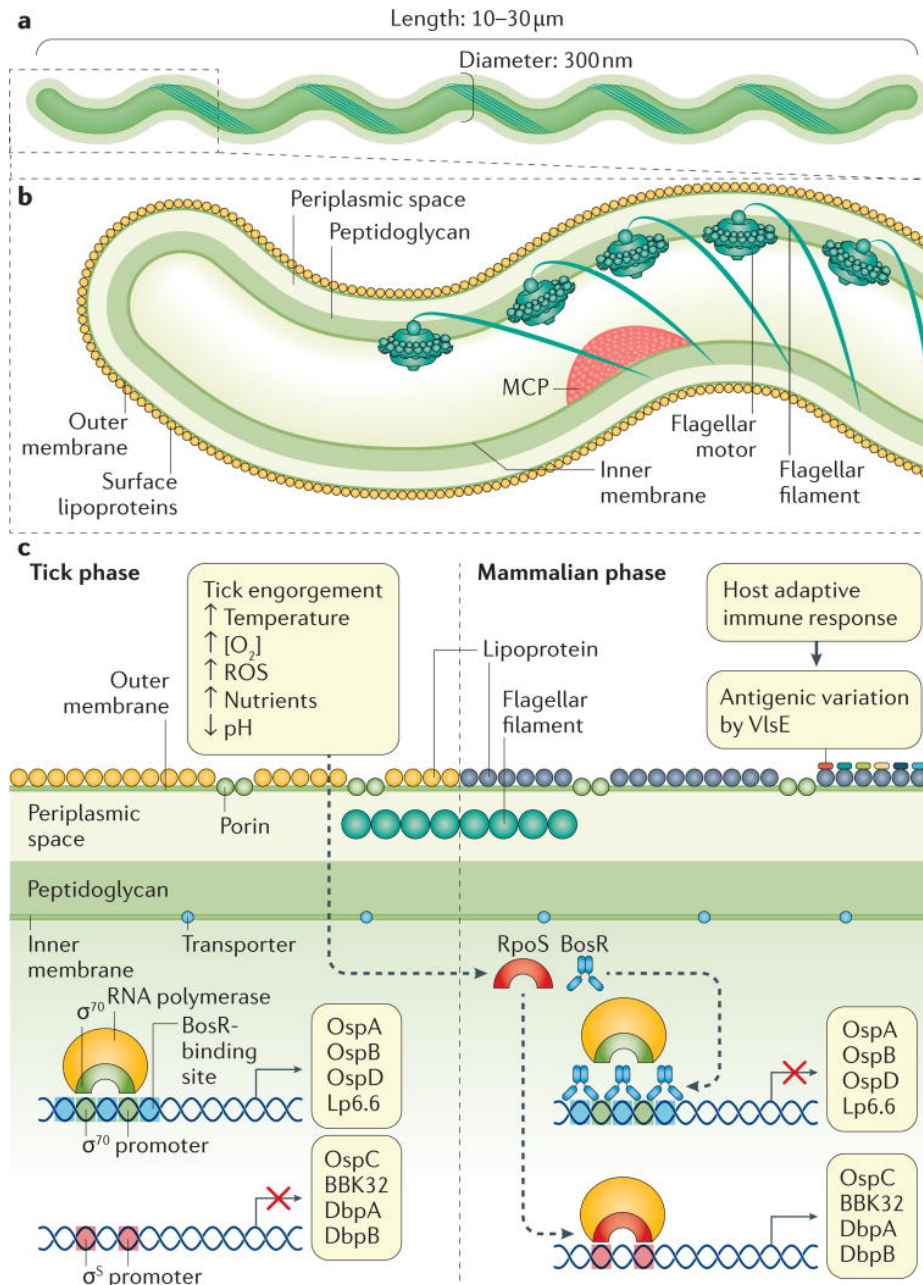


Figura 1. Morfología y arquitectura celular de *Borrelia burgdorferi* s.l.

a | " *Borrelia burgdorferi* tiene una morfología de onda plana, tiene 300 nm de diámetro y 10–30 μm de longitud. **b** | Un modelo 3D en color de un extremo de *B. burgdorferi*. Los filamentos flagelares están confinados al espacio periplásmico y anclados a cada polo celular por los motores flagelares, que se encuentran junto a las proteínas de quimiotaxis. **c** | La membrana externa consiste en una bicapa lipídica con alto contenido de lipoproteínas, que se expresan en la infección. En estado larvario de la garrapata, la bacteria expresa las lipoproteínas, en estado ninfa esta actividad es bloqueada y se vuelve a expresar en estado adulto a través de una red reguladora compleja, que incluye, entre otros, el estrés oxidativo de *Borrelia* regulador (BosR) y la ARN polimerasa alternativa σ -factor RpoS. A medida que el huésped monta una respuesta inmune adaptativa la proteína C de la superficie externa (OspC) se bloquea y VlsE, se expresa en la superficie bacteriana" Tomado de: (Steere et al., 2016).

1.1.2 Ciclo Biológico de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Su ciclo de vida resulta complejo, debido a su paso entre artrópodos vectores hematófagos (garrapatas) y hospedadores vertebrados como aves, roedores u otros micromamíferos y mamíferos de gran tamaño. En Europa, son las garrapatas de la especie *Ixodes ricinus* las que transmiten la enfermedad (BL) al ser humano (Figura 2). Dichos artrópodos existen tanto en etapas de vida libre como en fases parasitarias, presentando tres estadios de desarrollo: larva, ninfa y adultos (macho y hembra). La hembra adulta muere al poner los huevos, que eclosionan dando origen a las larvas. Éstas adquieren *B. burgdorferi* s.l. al alimentarse (una sola vez) sobre un animal silvestre de pequeño tamaño infectado con la bacteria, y mudan a la siguiente fase (ninfas). Las ninfas se alimentan de nuevo una sola vez sobre su hospedador, que puede ser un ave, un roedor o un pequeño mamífero. Al estar repletas, caen al suelo y mudan a adultos (machos o hembras). Las hembras a su vez pican a un hospedador, que suele ser un vertebrado de mayor tamaño (por ejemplo, un ciervo) y, tras ser fecundadas, caen a la vegetación para poner los huevos. El ser humano puede convertirse en huésped accidental si atraviesa una zona infestada de garrapatas (Bhate et al., 2011; Mannelli et al., 2012). Una vez que se convierten en portadores de *Borrelia*, las garrapatas afectadas son infecciosas el resto de sus vidas (Figura 3) (Little et al., 2010). El paso de la espiroqueta entre un estadio a otro se da por transmisión transestadial y son las ninfas en su mayoría las responsables de infectar al hombre (Kotál et al., 2015). Las investigaciones en la Rioja de la infección por *Borrelia burgdorferi* s.l., situaron la época de mayor riesgo, entre abril y junio, teniendo en cuenta que las condiciones climáticas son las más adecuadas para pasar tiempo libre en la naturaleza (Portillo et al., 2014).

Durante el acoplamiento, huésped-garrapata, la garrapata inyecta una mezcla compleja de productos bioactivos en el huésped, tales como inhibidores de citoquinas para modular la respuesta inmune del huésped, anestésicos y anticoagulantes para facilitar la alimentación. Se ha demostrado que la saliva de las garrapatas facilita la transferencia de patógenos al huésped vertebrado en virtud de estas propiedades farmacológicas. El momento óptimo para el crecimiento y transmisión de *B. burgdorferi* s.l. es el de repleción de la garrapata,

una vez el ixódido se ha alimentado alrededor de 1,5 a 2 días. Sólo las espiroquetas "adaptadas" recorren desde la hemolinfa a las glándulas salivares y luego al flujo sanguíneo del hospedador donde logran evadir el sistema inmune, varían su expresión génica y se adaptan al entorno, para luego diseminarse en algunos casos a diferentes órganos (Tilly et al., 2008; Kotál et al., 2015). El riesgo promedio de infección humana después de una picadura de garrapata en una región endémica es inferior al 5% (Bhate et al., 2011).

En condiciones desfavorables para su crecimiento y reproducción, logran cambiar su morfología de espiroqueta a formas quísticas, garantizando así su supervivencia por largos períodos en el sistema nervioso central (SNC) y periférico y en articulaciones, volviendo a su estado normal al mejorar las condiciones de su entorno (Krupka et al., 2007;González et al., 2013).

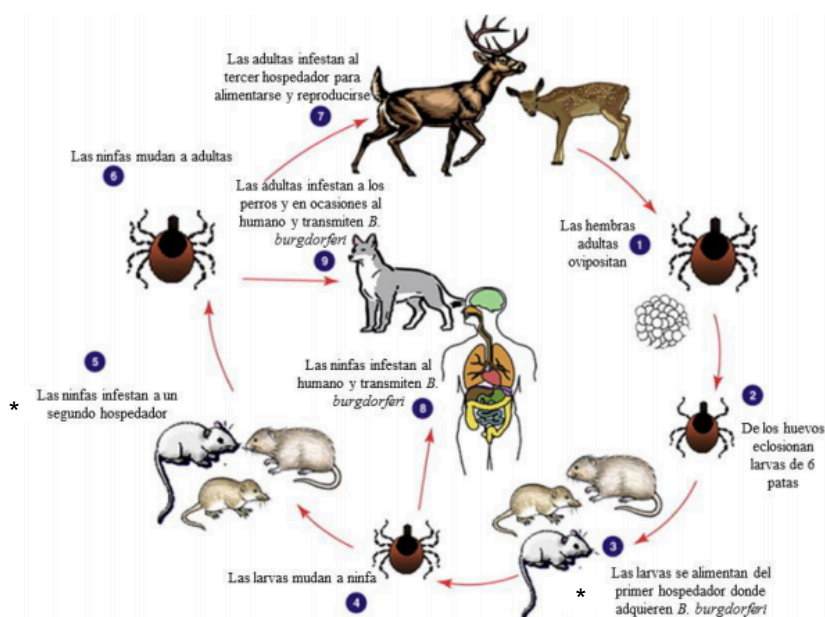


Figura 2. *Ixodes ricinus*

Tomado de: Guía de actuación ante picadura de garrapata (2016).

Figura 3. Ciclo de transmisión y mantenimiento de *Borrelia burgdorferi* s.l. en garrapatas.

*Hospedador: puede ser un roedor, pero también un ave, u otro vertebrado de pequeño tamaño.

Tomado de: (Little et al., 2010)

El mantenimiento de *B. burgdorferi* s.l. depende de vectores competentes y la interacción entre huésped y vector, a nivel mundial destacan cuatro especies de garrapatas, como vectores principales para la transmisión de *B. burgdorferi* s.l. en humanos, pertenecientes al complejo *Ixodes ricinus*. Los ciclos enzoóticos naturales de *B. burgdorferi* s.l. son complejos y varían según la ubicación geográfica. En Estados Unidos, por ejemplo, prevalece en algunos roedores la especie *I. scapularis*, sin embargo, es *I. ricinus* quien domina el territorio europeo y se alimenta de alrededor de 300 especies animales, incluidos mamíferos, aves, reptiles y roedores, siendo uno de los más importantes los ratones (*Apodemus* spp.). También se sabe que algunas aves son un reservorio importante para *B. garinii* y pueden adquirir la infección, y transmitir las espiroquetas a las larvas de garrapata de forma viable, pero a diferencia de los ratones, en ellas la infección es episódica, decae y desaparece al poco tiempo, aunque pueden ser reinfectadas sucesivamente. Las aves migratorias podrían tener un papel en la expansión de la gama de garrapatas a nuevas áreas (Figura 4) (Ogden et al., 2008; Gern, 2009; Palomar et al., 2012; Steere et al., 2016).

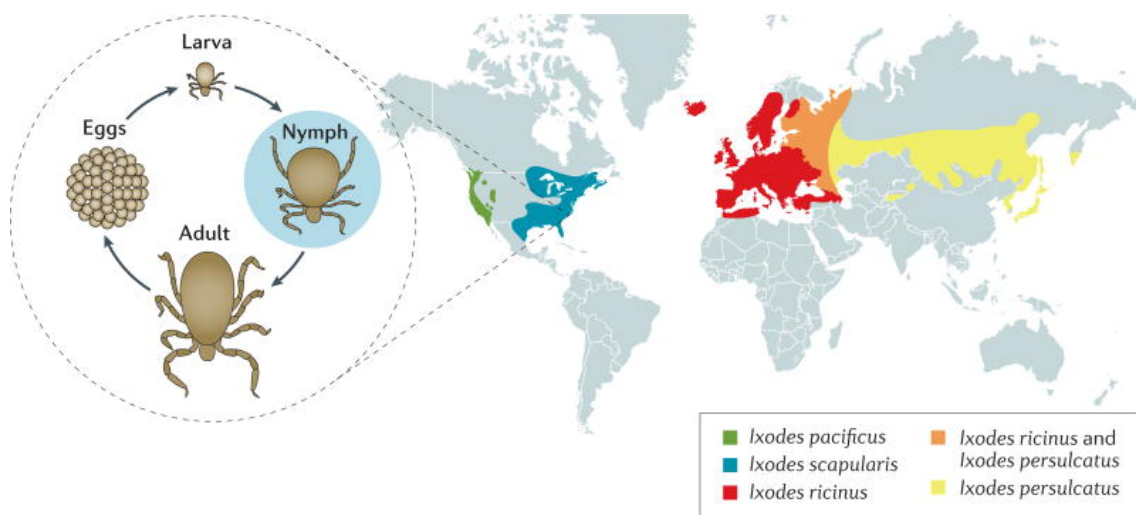


Figura 4. Distribución de garrapatas *Ixodes* que transmiten *Borrelia burgdorferi* s.l. a humanos. Tomada de: (Steere et al., 2016).

1.2 Epidemiología de Borreliosis de Lyme

La BL constituye la enfermedad transmitida por artrópodos de mayor prevalencia en las regiones templadas del hemisferio norte. Se estiman 255.000 casos anuales en el mundo. Aunque se comunica mayor prevalencia en Estados Unidos y Europa, ha cobrado una especial importancia a nivel mundial por su alta incidencia, su extensa distribución y la gravedad de sus manifestaciones clínicas (Schwaiger et al., 2001;González, 2013; Solís et al., 2016).

En Europa, la BL no se encuentra entre las enfermedades de declaración obligatoria, por lo que existe un subregistro significativo del evento y se estima que la tasa de incidencia real de enfermedad puede ser 2-3 veces mayor que la informada. Actualmente no se tienen cifras confiables sobre su incidencia real en países europeos, pero se estima una incidencia anual de alrededor de 85.000 casos por año y la mayor incidencia se encuentra en los países escandinavos y en Europa central (Austria, Eslovenia y Alemania)(Wilking & Stark, 2014; Bonet et al., 2016).

En Alemania una evaluación de los registros de salud poblacionales de nueve estados del Este entre 2013 – 2017, encontró una incidencia variable de 0,5 - 138 casos por 100.000 habitantes, lo que se traduce en más de 200.000 casos anuales en todo el país (Enkelmann et al., 2018). Mientras que Eslovenia y Austria reportan las tasas más altas, con 206 y 135 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente. La tasa de incidencia promedio ponderada por población calculada para la carga regional de BL en Europa occidental es de 22,05 casos por 100.000 personas por año (Nikolić et al., 2020). Por ejemplo, en Francia, la tasa de incidencia anual fue de 53 / 100.000 entre 2009 y 2017 (Figoni et al., 2019). En Inglaterra y Gales, hubo un aumento significativo en la incidencia de 0,08 casos / 100.000 en 1998, a 0,53 casos / 100.000 en 2015 (Tulloch et al., 2019). En el norte de Italia (Lombardía), solo hubo 1,24 casos nuevos por 1 millón de residentes entre 2000 y 2015 (Petrulionienė et al., 2020). En los Estados Unidos, donde se reporta la segunda mayor incidencia a nivel mundial, el promedio anual es de 39,5 casos por cada 100.000 personas (noreste, medio Atlántico y medio oeste superior del país) (Nikolić et al., 2020). Además de las

áreas mencionadas anteriormente, se han comunicado casos en lugares más tropicales y puede existir en Australia.

La distribución geográfica de BL se correlaciona estrechamente con el rango del vector principal, las garrapatas del complejo *I. ricinus*. En España la mayoría de los casos de BL se diagnostican en la mitad norte de la Península con zonas endémicas como La Rioja, Navarra, Norte de Castilla y León, Asturias, Cantabria y País Vasco. En la Rioja la BL en su forma precoz cutánea localizada presenta una incidencia estimada de 3-5 casos/100.000 habitantes/año (Escudero et al., 2000; Portillo et al., 2014; Bonet et al., 2016).

Las manifestaciones clínicas de BL en Europa presentan una distribución geográfica diversa. Esta distribución desigual también es evidente al hablar del reservorio o huéspedes de *Borrelia* spp. Por ejemplo, *B. afzelii* tiende a asociarse con roedores, *B. valaisiana* y *B. garinii* con aves. El cambio en las rutas migratorias de las aves propiciado por el calentamiento global podría conllevar una nueva distribución geográfica de los artrópodos, e incluso instaurarse nuevas genoespecies de *B. burgdorferi* s.l. (Portillo et al., 2014; Rudenko et al., 2011).

1.3 Manifestaciones clínicas de Borreliosis de Lyme

Es una enfermedad multisistémica causada por espiroquetas del complejo *Borrelia burgdorferi* s.l., principalmente por *B. garinii*, *B. afzelii* y *B. burgdorferi* s.s, con una variedad de afecciones clínicas que presenta predilección por la piel, el sistema nervioso central y periférico, articulaciones y corazón, de ahí que se conozca como “el último gran imitador”. Los síntomas aparecen en diferentes estados clínicos dependiendo de la diseminación de la bacteria a través de la sangre y el tejido, inicia con una infección localizada conocida como eritema migratorio (EM) en el sitio de la picadura. Estudios europeos han demostrado que la BL se manifiesta en un 80-90% de los pacientes como una enfermedad de la piel y en otros órganos en alrededor del 10-20% de los pacientes (Portillo et al., 2014; Jungnick et al., 2015; Hofmann et al., 2017).

Afecta a cada paciente de manera individual e incluso se observa un comportamiento geográfico diferente, atribuible a la diversidad de especies, factores relacionados con el huésped humano y el vector. Los estudios realizados a nivel de especie asocian a *B. afzelii* con acrodermatitis crónica atrófica (ACA) mientras que *B. garinii* y *B. bavariensis*, se asocian con mayor frecuencia a neuroborreliosis. Estas dos últimas son, aparentemente, más invasivas, pudiendo diseminarse desde el sitio de inoculación a otros tejidos y sobrevivir a la respuesta inmune temprana (Jungnick et al., 2015;Coipan et al., 2016).

Con el propósito de simplificar el enfoque diagnóstico, las manifestaciones clínicas se dividen en tres estadios: enfermedad temprana localizada, enfermedad temprana diseminada y enfermedad tardía (Figura 5), teniendo en cuenta que existe además una forma crónica denominada síndrome post-Lyme (PLDS). Las manifestaciones asociadas a cada estadio pueden presentarse de manera simultánea, o bien de manera aislada sin la existencia de otros signos y síntomas característicos de estadios previos o incluso haber pasado inadvertidos (Rudenko et al., 2011;Meléndez et al.,2014).

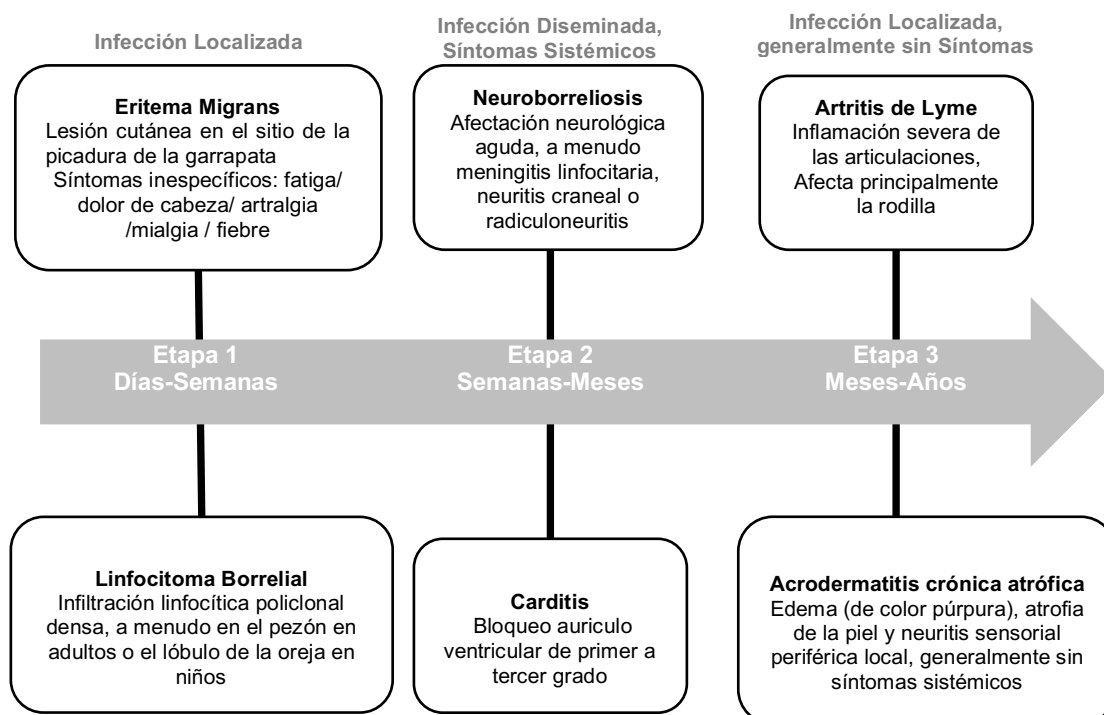


Figura 5. Etapas y características clínicas más comunes de la Borreliosis de Lyme.

Adaptada de:(Steere et al., 2016).

1.3.1 Enfermedad Temprana Localizada (etapa 1)

EM es la manifestación más frecuente de BL en Europa, representando casi el 90% de todos los casos (Huppertz et al., 2012). Consiste en una lesión cutánea en el sitio de la picadura de la garrapata y es un signo cardinal patognomónico de la enfermedad. Se caracteriza por ser anular, eritematosa de borde rojo-vinoso con un aclaramiento central y con un diámetro medio de 15 cm, aunque en ocasiones puede adoptar diversas morfologías y tonalidades; generalmente está elevada, pica ligeramente y es indolora, se resuelve en menos de 30 días, incluso en ausencia de tratamiento. Se observa principalmente en la espalda, cara interna de los muslos, axilas y piernas (Figura 6 y 7). Cuando persiste más de cuatro semanas se denomina eritema crónico migratorio (ECM) (Rudenko et al., 2011; Huppertz et al., 2012; Schoen et al., 2020).

Algunos pacientes permanecen asintomáticos, pero la mayoría presenta síntomas inespecíficos, como fatiga, dolor de cabeza, artralgia, mialgia, linfadenopatía y fiebre, que, al no ser tratados, pueden persistir por semanas o meses. La PCR de la biopsia de piel, es la prueba ideal para confirmar el diagnóstico, alcanzando resultados positivos en aproximadamente el 70% de los casos. Sin embargo, la biopsia de piel rara vez se justifica (Ružić-Sabljić et al., 2008). El análisis histopatológico en estos pacientes revela un infiltrado perivascular leve y profundo con eosinófilos centrales y células plasmáticas periféricas (Ružić-Sabljić et al., 2008; Solomon et al., 2014; Schoen, 2020).

1.3.2 Enfermedad Temprana Diseminada (etapa 2)

Al diseminarse la infección, afecta el sistema musculoesquelético (60%), SNC (10%), y corazón (5%), generando principalmente neuroborreliosis precoz y meningorradiculitis linfocitaria, aunque a su vez pueden aparecer lesiones secundarias anulares o múltiples EM en la piel, neuropatía craneal, radiculoneuritis, bloqueo nodal atrioventricular, dolor musculoesquelético migratorio en articulaciones, tendones, músculos o hueso, y raramente manifestaciones oculares como episcleritis, queratitis intersticial entre otras (González, 2013; Meléndez et al., 2014). Esta etapa se ha relacionado más con *B. burgdorferi* s.s. que disemina más fácil y con mayor frecuencia que *B. afzelii*,

quien puede persistir en los sitios de infección durante meses o años, mientras que *B. garinii* es particularmente neurotrópico (Steere et al., 2016).

Los pacientes con EM no tratados desarrollan neuroborreliosis en el 10-15% de los casos, presentando por lo general cefaleas episódicas, rigidez leve en el cuello, neuropatía craneal o radiculoneuritis motora o sensorial, muy ocasionalmente pueden presentar ataxia cerebelosa o encefalomielitis. Tiene una ligera preponderancia en hombres y un pico bimodal que afecta a niños / adolescentes y adultos mayores de 50 años (Garza et al., 2019; Steere et al., 2016). En estos pacientes la evaluación del líquido cefalorraquídeo (LCR) generalmente muestra una pleocitosis linfocítica, una concentración de proteína ligeramente elevada y una concentración de glucosa normal, con evidencia de producción intratecal de anticuerpos (Gerold Stanek, Wormser, Gray, & Strle, 2012).

En Europa, *B. garinii* tiende a causar una afectación neurológica, conocida como síndrome de Bannwarth (parálisis facial bilateral) o meningorradiculitis dolorosa, asociada a radiculoneuritis dolorosa, meningitis linfocítica neuropatía craneal o paresias de las extremidades; por su parte *B. afzelii* también puede generar problemas neurológicos. Sin embargo, no son tan claros como los provocados por *B. garinii* (Gómez-Eguílaz et al., 2016; Ogrinc et al., 2016).

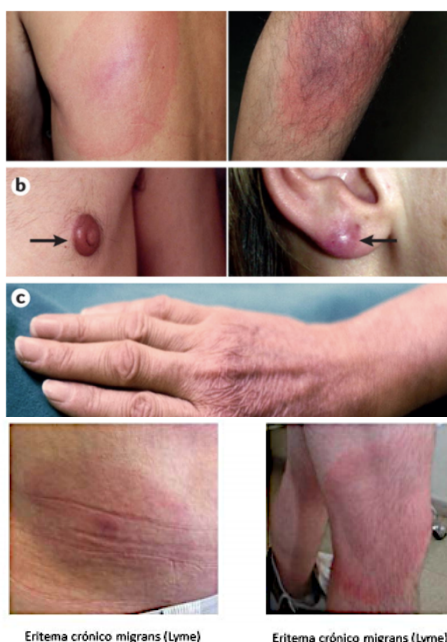
Durante la infección diseminada temprana suele presentarse también alteraciones cardíacas que se manifiestan como grados fluctuantes de bloqueo en la conducción auriculo-ventricular. Esto ocurre en aproximadamente el 0,8% de todos los casos de BL notificados a los CDC y con terapia adecuada resuelven en semanas (CDC, 2013). En Europa se informa afectación cardíaca en 1 a 2% de los casos de BL, con mayor prevalencia en hombres adultos. Los síntomas incluyen palpitaciones, síncope o presíncope, disnea y dolor en el pecho, siendo más común las anomalías de la conducción cardíaca (Robinson et al., 2015).

1.3.3 Enfermedad Diseminada Tardía (etapa 3)

En Europa es raro que se presente este estadio de la enfermedad. Se caracteriza por la aparición de neuroborreliosis tardía, ACA y artritis. Siendo la más frecuente la ACA, que progresa de manera lenta, afectando principalmente la superficie extensora de las extremidades distales. Al parecer se presenta exclusivamente en Europa, donde afecta a alrededor del 10% de los pacientes, con mayor frecuencia en mujeres adultas (Garza et al., 2019).

Alrededor del 20% de los pacientes con ACA tienen como antecedente una lesión anterior de EM curada espontáneamente, generalmente en una extremidad donde la lesión de ACA se desarrolló de 6 meses a 8 años más tarde (Steere et al., 2016a). Estas lesiones comienzan como placas de color rojo azulado con edema que progresan lentamente a lo largo de los años hasta placas atróficas e hiperpigmentadas con una apariencia de piel de "papel de cigarrillo", culminando con una piel severamente atrófica con pérdida de nexos y visibilidad de los vasos sanguíneos subyacentes (Figura 6) (Garza et al., 2019).

Figura 6. Manifestaciones dermatológicas de la borreliosis de Lyme.



"a| Lesiones clásicas de EM, con un borde exterior rojo más brillante, un claro central parcial y un centro de ojo de buey. Otras lesiones de EM pueden tener una inflamación más intensa y una decoloración púrpura en el centro. b | El linfocitoma borrelial (flechas) es una lesión subaguda que generalmente ocurre en el pezón en adultos o en el lóbulo de la oreja en niños. c| ACA es la manifestación tardía más común de la BL en algunos países de Europa. Estas lesiones tienen una fase inflamatoria con un color rojizo o azul seguido de una fase atrófica, en la cual la piel se adelgaza considerablemente, a veces con características fibróticas" Tomada de: (Steere et al., 2016).

Figura 7. Lesiones clásicas de eritema migratorio.

Tomado de: Guía de actuación ante picadura de garrapata (2016).

Debido a una gran variedad de falsos positivos se hace necesario un examen histopatológico para el diagnóstico definitivo en todos los casos, donde se evidencia la presencia de linfocitos, células plasmáticas e histiocitos, infiltrado perivascular e intersticial con telangiectasia. El cultivo de *B. burgdorferi* s.l. de las lesiones de ACA tiene éxito en aproximadamente el 40% de los pacientes y el análisis por PCR del DNA específico de *B. burgdorferi* s.l. tiene una sensibilidad del 20-80% (Müllegger & Glatz, 2008).

Por su parte la artritis oligoarticular asimétrica, especialmente en las rodillas, ocurre en aproximadamente el 60% de los pacientes no tratados a una media de 6 meses desde el inicio de la enfermedad, cursa con una severa inflamación de las articulaciones, con dolor moderado o leve y en la mayoría de los casos disminuye con un tratamiento antibiótico adecuado y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos. Algunos de estos pacientes tendrán artritis persistente después de la terapia con antibióticos, clasificada como artritis de Lyme refractaria a los antibióticos (Arvikar & Steere, 2015; Garza et al., 2019).

1.3.4 Síndrome post-Lyme (PLDS) o síndrome de la enfermedad de Lyme posterior al tratamiento (PTLDS).

Los pacientes que padecen la BL suelen curarse con tratamiento antibiótico de 3 a 4 semanas. Sin embargo, las reacciones inflamatorias pueden persistir y alrededor del 10% de los pacientes continúan experimentando dolor musculoesquelético y síntomas cognitivos, además de fatiga, dificultad para dormir, artralgia, mialgia, deterioro de la memoria y dolor de cabeza. La población de pacientes afectados está asociada a un deterioro considerable de la calidad de vida relacionada con la salud (Chandra et al., 2011; Ścieszka et al., 2015).

Los síntomas pueden ser intermitentes o constantes, y a menudo son de naturaleza subjetiva y variada. No existe una definición única de caso para PTLDS, y su diagnóstico y tratamiento es complicado. Al parecer, su incidencia está asociada a factores de riesgo como el retraso en el diagnóstico y el tratamiento, y un peor pronóstico de la enfermedad; si bien no existe un consenso sobre estos aspectos (DeLong, Hsu, & Kotsoris, 2019).

1.4 Diagnóstico de Borreliosis de Lyme

El diagnóstico de la BL debe basarse en manifestaciones clínicas compatibles con infección por *B. burgdorferi* s.l. junto al antecedente de picadura de garrapata, o su posibilidad, en un contexto epidemiológico adecuado (es decir, en zonas en las que exista la garrapata vector). Ante la presencia de manifestaciones clínicas compatibles con BL (excepto el EM, que es un signo patognomónico de la enfermedad), deben realizarse pruebas de confirmación microbiológica. El cultivo es la prueba microbiológica de referencia, pero no es de utilidad en la rutina del laboratorio clínico. La visualización de espiroquetas mediante tinciones o microscopía de campo oscuro tampoco tiene utilidad diagnóstica, ya que la espiroquetemia es muy fugaz, sólo se da en las fases iniciales de la enfermedad y se necesita cultivo o serología para confirmación. En la mayoría de los casos, el diagnóstico de laboratorio se realiza mediante técnicas serológicas, siendo necesaria una estrategia en dos pasos. Las técnicas de biología molecular (PCR y secuenciación) pueden servir de apoyo diagnóstico en algunos casos, aunque no están estandarizadas y su rentabilidad generalmente es baja. La inespecificidad de la clínica y la falta de pruebas microbiológicas con suficiente sensibilidad y especificidad para confirmar la infección por *B. burgdorferi* s.l., han propiciado el desarrollo de técnicas, como el ELISPOT u otras, que no han sido aprobadas por ninguna agencia o sociedad científica como válidas para el diagnóstico y que están desaconsejadas (Portillo et al., 2014).

En un primer momento, la realización de mis prácticas externas en el grupo de Artrópodos Vectores del CIBIR tenía como objetivo el cultivo de diferentes genoespecies de *Borrelia burgdorferi* s.l. como paso previo al diseño de una prueba de ELISPOT para evaluar su utilidad como herramienta de apoyo diagnóstico en pacientes con BL confirmada. Con estas actividades se pretendía el aprendizaje de técnicas en relación al proyecto de investigación en salud financiado por el Instituto de Salud Carlos III “¿Es útil el ELISPOT para el diagnóstico de la borreliosis de Lyme? Buscando la respuesta”, que actualmente desarrolla el equipo investigador (proyecto PI18-01772). Ante la pandemia por COVID-19, debido a la imposibilidad de realizar prácticas presenciales durante

el estado de alarma, se decidió realizar un trabajo de revisión bibliográfica relacionado con la materia.

2. OBJETIVOS

Realizar una revisión bibliográfica de los diferentes medios de cultivo utilizados para el aislamiento de *Borrelia* spp. y del valor de las pruebas microbiológicas (validadas y no validadas) para el diagnóstico de la BL.

3. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

3.1 Estrategia de búsqueda

Se realizó una revisión narrativa, empleando una estrategia de búsqueda bibliográfica sistematizada. La selección de los artículos se llevó a cabo a partir de una búsqueda inicial en PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), empleando la combinación de los siguientes términos MeSH “Lyme borreliosis” or “*Borrelia burgdorferi* s.l” or “Lyme disease”, and “diagnostic tests”, “rapid diagnostic test”, “unconventional diagnostic tests”, “culture”, “methods; molecular”, “PCR-based assay”, “xenodiagnosis”, “microscopy”, “focus-floating microscopy”, “dark-field microscopy”, “silver-stain microscopy”, “CXCL-13”, “CCL-19”, “apolipoprotein B-100”, “lymphocyte transformation test”, “interferon”, “CD57”.

En Google Scholar (<https://scholar.google.es/>), se realizó la búsqueda empleando la combinación de los términos para identificar los estudios: “Lyme disease OR borreliosis AND “diagnostic tests” OR “diagnosis”.

3.2 Selección de estudios

Se incluyeron estudios realizados en Europa sin restricciones de idioma, ni fecha de publicación. Además, se revisaron las referencias de los artículos obtenidos para identificar estudios adicionales para su potencial inclusión.

Se recuperaron los textos completos de todos los artículos obtenidos a partir de la búsqueda realizada, relacionados con los métodos diagnósticos validados y no validados para la BL, después de revisar los títulos y resúmenes de cada publicación, para determinar si el estudio cumplía con los criterios de elegibilidad.

Los estudios seleccionados para su análisis debían proporcionar las estimaciones válidas de sensibilidad y especificidad, también estimaciones de prevalencia y valores predictivos de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de BL.

Para el tamizaje y selección final de los estudios, los estudios se separaron en tres grupos y los registros se importaron al software de gestión de referencias bibliográficas ReadCube Papers aplicación online y desktop, versión 4.0.8 (<https://www.papersapp.com/>), (Copyright © 2011-2020 Digital Science & Research).

Grupo 1

Se incluyeron estudios de los medios de cultivo empleados para el aislamiento de *Borrelia* spp.

Grupo 2

Se incluyeron estudios sobre ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) o Inmufluorescencia indirecta (IFA), Inmunoblot o Western-blot.

Grupo 3

Se incluyeron investigaciones de las pruebas no validadas para el diagnóstico de la BL, organizadas en cuatro categorías:

1. Pruebas de evaluación de la respuestas inflamatoria y autoinmune: CXCL-13, CCL-19, Apolipoproteína B100.
2. Pruebas de evaluación de la inmunidad celular: prueba de transformación de linfocitos, ELISpot interferón- γ (IFN- γ), IFN-alfa, células CD57 + NK.
3. Pruebas microbiológicas directas: xenodiagnóstico, microscopía, detección de proteínas de membrana OspA.
4. Técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4. CULTIVO Y AISLAMIENTO DE *Borrelia* spp.

El cultivo y aislamiento de borrelias no suele emplearse de manera rutinaria en el diagnóstico de BL. Resulta laborioso, de crecimiento lento, de aproximadamente 12 semanas, de fácil contaminación y sensibilidad limitada, aunque presenta un rendimiento aceptable en muestras de biopsia procedentes de EM. En la mayoría de los casos se realiza con fines de investigación o en los centros de referencia y por personal capacitado (Ružić-Sabljić et al., 2017). Las sensibilidades reportadas varían desde un 5% hasta un máximo de 88% en muestras de piel y solo un 40-44% para muestras de sangre periférica. Rara vez se recuperan espiroquetas del tejido articular, LCR o cualquier otro tejido en la enfermedad tardía (Sapi et al., 2013).

Para el cultivo de *Borrelia* spp. es necesario una recolección y preparación de muestras en condiciones asépticas. En el transporte de muestras de biopsias se emplea solución salina estéril o medio de cultivo adecuado y en fluidos corporales no se deben emplear aditivos y ser trasladadas para su análisis dentro de 2 a 4 horas (Brouqui et al., 2004).

Borrelia spp. son organismos fastidiosos, quimioheterotróficos que emplean carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga como fuentes de carbono y energía. Según la especie, el crecimiento se da en condiciones anaeróbicas, facultativamente anaerobias, microaerófilas o aeróbicas. Se ha demostrado que las mejores condiciones de incubación se dan a temperaturas de entre 33 y 37 °C, con una atmósfera anaeróbica o microaerófila, durante un periodo máximo de 12 semanas. Debido a la falta o al limitado potencial biosintético, necesita requisitos nutricionales complejos en su cultivo (Lagier et al., 2015). La tasa de aislamiento y recuperación se ve limitada por los cambios que sufren estos organismos en la adaptación al medio artificial, aunque también se ve influenciado por otros factores, como la cantidad de espiroquetas en la muestra seleccionada, tratamiento antibiótico previo, anestesia en el sitio de la biopsia, condiciones de transporte al laboratorio y un entorno aséptico para el mantenimiento del cultivo (Ružić-Sabljić et al., 2014; Ružić-Sabljić et al., 2017).

Se han empleado diversos medios de cultivos en la recuperación de borrelias, destacando los medios líquidos, Kelly-Pettenkofer modificado (MKP), Barbour-Stoenner- Kelly (agar BSK) descrito por Burgdorfer et al. en 1981 (Barbour & Benach, 2019) y otros modificados del mismo, como agar BSK-II y agar BSK-H. Estos medios son equivalentes en la mayoría de sus componentes, como por ejemplo N-Acetil glucosamina, albúmina de suero bovino y suero de conejo; sin embargo, difieren en concentración, origen, forma de preparación y en algunos componentes: por ejemplo, MKP carece de extracto de levadura presente en BSK-II y BSK-H, pero, en contraste con BSK-II y BSK-H, contiene gelatina (Ružić-Sabljić et al., 2006).

Sapi et al. (2013) lograron un método de cultivo de *Borrelia*, mejorado (BSK-H) a partir de muestras de sangre humana con una tasa de éxito del 94%. Los resultados de este estudio mostraron que, al optimizar las condiciones de recolección y transporte, los medios, el entorno de crecimiento y el desarrollo de un método de cultivo a largo plazo en conjunto, proporcionaron mejores condiciones de crecimiento para *Borrelia*. Entre los cambios realizados por estos autores destaca una mayor concentración de suero de conejo (12% en lugar de 6%), una alta concentración de ditioneitol-DTT (100 µg / ml), incubación a 34 °C con 5% de CO₂ y 100% de humedad, empleando tapas parcialmente cerradas, una baja concentración de rifampicina (0,4-0,5 µg / ml), el uso de tubos de propileno de 2 y 15 ml y finalmente el empleo de tubos Falcon estériles de 15 ml con 5 ml del medio BSK-H en la recolección de la muestra sanguínea (Sapi et al., 2013).

También han logrado cultivar con éxito en medio BSK solidificado con agarosa al 1,5%, eliminando contaminantes con ácido nalidíxico y 5-fluorouracilo. En este caso las cepas primarias de muestras clínicas pueden tardar hasta varias semanas en crecer, se dividen cada 8 a 12 h durante la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, se logran densidades celulares de 10⁷ a 10⁸ células/ml después del cultivo in vitro entre 5 y 7 días (Lagier et al., 2015).

Veinovic et al. (2014) demostraron el efecto en el tiempo de almacenamiento del medio MKP en el crecimiento y multiplicación. El mejor crecimiento en términos de número de células/ml lo lograron con el medio fresco (preparado menos de 1 mes antes uso), mientras que el crecimiento más pobre se obtuvo con medio MKP almacenado durante 12 meses. No hallaron diferencias en la morfología y la motilidad de las especies de *Borrelia* (Veinović et al., 2014).

Marques et al. (2000) evaluaron el medio de cultivo MPM empleando una cepa de referencia de *B. burgdorferi* y muestras aisladas de pacientes con PLDS. Al evaluar el crecimiento observaron que para el día 4, la mayoría de los organismos en este medio no eran viables y no crecieron cuando se transfirieron a medio fresco, en contraste con el medio BSK, en el que aún en la tercera semana continuaban siendo viables. Estos resultados refuerzan el uso del medio BSK como la opción principal para el cultivo de *B. burgdorferi* (Marques, et al., 2000).

Estudios recientes han intentado mejorar las condiciones de los medios de cultivo cambiando los protocolos tradicionales, empleando, por ejemplo 60 ml de BSK en un tubo cerrado, incubado entre 32 a 33 °C durante 8–12 semanas. También han intentado cultivar inicialmente en diversos volúmenes de 15 ml y 2 ml, y al sexto día pasarlo a 15 ml de BSK fresco en jarra de anaerobiosis por 16 semanas a 34°C. Otras variaciones que reflejaron efectos positivos en el crecimiento de *B. burgdorferi* son la adición de suero, agentes reductores y antibióticos como la rifampicina (Waddell et al., 2016).

Por su parte *B. burgdorferi* s.l. puede recuperarse de varios tejidos y fluidos corporales de pacientes con BL, tales como; biopsias de piel en lesiones cutáneas, LCR, sangre total, plasma e incluso de líquido sinovial y tejido cardíaco (Aguero-Rosenfeld et al., 2005). Se ha demostrado que *B. burgdorferi* puede aislarse en un 50% de muestras de biopsia tomadas de lesiones de EM no tratadas. En un volumen de 9 ml de plasma de pacientes con enfermedad temprana que no han recibido antibióticos, tienen un rendimiento de aproximadamente el 40%. El cultivo del LCR tiene un rendimiento inferior al 10%, y es extremadamente raro aislar la espiroqueta del líquido articular (Marques, et

al.,2010). La tasa de recuperación de *B. burgdorferi* s.s. de la sangre o de los componentes sanguíneos de pacientes con EM no tratados es, por lo del general el 5% o menor (Aguero-Rosenfeld et al., 2005).

En la confirmación del aislamiento bacteriano se ha demostrado que la realización de PCR mejora la sensibilidad en comparación con la confirmación visual mediante tinción con naranja de acridina o utilizando microscopía de campo oscuro y microscopía fluorescente (Waddell et al., 2016).

Finalmente, se recomienda en la detección microbiológica de *B. burgdorferi* s.l. que *“La detección directa por cultivo solo debe usarse en casos ambiguos con diagnóstico diferencial, el cultivo de Borrelia burgdorferi s.l. debe limitarse a laboratorios especializados y los resultados positivos del cultivo deben confirmarse utilizando métodos biológicos moleculares adecuados”* (Hofmann et al., 2017).

5. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS VALIDADAS

5.1 Diagnóstico Serológico

El serodiagnóstico de la BL consiste en confirmar si el sistema inmune del paciente ha estado en contacto con *B. burgdorferi* s.l. Las recomendaciones actuales se basan en un enfoque de dos pruebas, también conocido como prueba de dos niveles; un ensayo ELISA o IFA, seguido de una transferencia mediante Western-blot cuando los resultados son indeterminados o positivos, tanto en Europa como en América (Marques et al.,2010; Eldin et al.,2019). La confirmación serológica de la infección se ve obstaculizada por una variedad de problemas: los anticuerpos(Ac) frente a *Borrelia* spp. son de desarrollo lento y pueden no producirse en caso de tratamiento precoz. Los niveles de IgM generalmente no se detectan durante las primeras semanas pos-infección y pueden dar lugar a falsos positivos. La IgG a menudo no emerge hasta la cuarta o sexta semana. Por otro lado, estos Ac pueden persistir durante años en algunos pacientes, lo que hace que sea imposible distinguir entre infecciones pasadas y recientes, basadas solo en la seropositividad (Borchers et al., 2015). Existe la necesidad de mejorar los métodos de detección de la infección por *B. burgdorferi* s.l. con anticuerpos más sensibles y otros enfoques que dependen de la disponibilidad de muestras biológicas de calidad asociadas a datos clínicos confiables (Sapi et al., 2013; Schmitz, 2020).

En Europa las pruebas empleadas en el diagnóstico de BL no se someten a ninguna forma de evaluación clínica obligatoria, encontrando en el mercado varios tipos de inmunoensayos, combinaciones de antígeno nativo y recombinante e incluso diversos datos de rendimiento; de ahí la variabilidad en los resultados que están sujetos al fabricante y tipo de prueba (Hofmann et al., 2017).

5.1.1 Enzimo-inmunoensayo (ELISA)

Esta técnica se basa en medir la respuesta de anticuerpos (Ac) IgG e IgM frente a antígenos (Ag) específicos de *Borrelia*. Estos Ag se encuentran adheridos en un pocillo y ante la presencia de anticuerpos contra *B. burgdorferi* s.l. en la muestra de suero humano, formarán complejos Ag-Ac, que se fijan a un conjugado anti-IgG o IgM humanos unido a una enzima (peroxidasa de rábano). Estos complejos se revelan al adicionar sustratos colorimétricos que se miden por espectrofotometría (Reboul et al., 2020). En el diagnóstico es importante tener en cuenta que los Ac-IgM son generalmente detectables de 3 a 6 semanas después del inicio de la enfermedad y los Ac-IgG alcanzan el pico de forma más lenta, pudiendo permanecer detectables durante meses e incluso años (Hofmann et al., 2017).

Su precisión diagnóstica en Europa es variable, con una sensibilidad promedio de 80% y una especificidad de 95%. Se ha estimado una sensibilidad en las pruebas comerciales en suero del 50% (IC_{95%} = 44-64%) en EM, 77% (IC_{95%} = 67-85%), en casos de neuroborreliosis, 97% (93–100%) en ACA (IC_{95%} = 94–99%) y 73% BL no especificada (IC_{95%} 53-87%). Demostraron a su vez que las IgM tienen una sensibilidad menor que la IgG en ACA y artritis, mientras que las IgG tienen una menor sensibilidad en la etapa localizada (Leefflang et al., 2016a). Otros estudios reportan una sensibilidad similar a la de estos autores (Waddell et al., 2016; Kodym et al., 2018).

En la actualidad no se ha identificado una respuesta de anticuerpos medible a un solo antígeno que muestre sensibilidad y especificidad adecuadas para eliminar la necesidad de pruebas de dos niveles. Sin embargo, ante la necesidad de mejorar el diagnóstico con métodos de mayor sensibilidad y especificidad se han diseñado técnicas de detección de segunda y tercera generación empleando diversas preparaciones antigénicas: lisado de células enteras mediante sonicado de cultivo de *B. burgdorferi*, antígenos nativos purificados (componentes flagelares), antígenos recombinantes, tales como OspA, OspC, BmpA, DbpA, p41, proteínas VlsE o péptidos sintéticos, que incluyen C6, una región de VlsE y "PepC10" que corresponde a los residuos de 10 aminoácidos C-terminales de

OspC (Ledue et al., 2008; Steere et al., 2016; Markowicz & Stanek, 2018; Reboul et al., 2020)

Se ha demostrado que el empleo de antígenos recombinantes de *B. burgdorferi*, aporta ventajas importantes; su estandarización es más fácil, debido al control de la composición y concentración de antígenos que no dependen del patrón de expresión real de una cepa cultivada. Sin embargo, el análisis realizado de las pruebas comerciales disponibles en el mercado denota una alta variabilidad en sensibilidad y especificidad (Notermans et al., 2011).

Un estudio reciente permitió comparar pruebas universales y específicas de *Borrelia* basadas en antígenos recombinantes y de células enteras, concluyendo que el empleo de ELISA basado en antígenos de células enteras tiene alta sensibilidad y un valor predictivo para las pruebas negativas que detectan IgG e IgM anti-borreliales, con especificidad y valores predictivos positivos bajos. Además, las pruebas basadas en Ag específicos de células enteras de *B. afzelii*, *B. garinii* y *B. burgdorferi* presentan baja sensibilidad y bajo valor predictivo negativo, resultando inadecuados para el diagnóstico y confirmación de la enfermedad. Los Ag recombinantes por su parte, tienen alta sensibilidad con alto valor predictivo negativo, pero presentan como desventaja la difícil interpretación de sus resultados (Kodym et al., 2018).

5.1.2 Inmufluorescencia indirecta (IFA) y otras técnicas de primer nivel

IFA es una técnica de primer nivel empleada en el serodiagnóstico de BL. Consiste metodológicamente en poner a reaccionar el antígeno de *Borrelia* que se encuentra fijo en un portaobjetos con el suero humano para el reconocimiento de anticuerpos. Tras incubarlo, se evidencia la interacción por medio de un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana conjugado con fluoresceína. Finalmente, el reconocimiento de anticuerpos específicos para *Borrelia* se evidencia por microscopía de fluorescencia, se realizan diluciones seriadas con los sueros reactivos y los títulos de IgM en 128 o IgG en 256 se consideran positivos (Aguero-Rosenfeld et al., 2005; Talagrand-Reboul et al., 2020). IFA es una técnica aceptable, precisa y altamente sensible para detectar anticuerpos

contra *B. burgdorferi*, solo si se cuenta con personal calificado, debido a la lectura subjetiva y su baja reproducibilidad (Aguero-Rosenfeld et al., 2005).

En la actualidad también se emplean otras técnicas equivalentes a ELISA e IFA como: ELFA (ensayo fluorescente ligado a enzimas), CLIA (ensayo de inmunoensayo de quimioluminiscencia) y MMIA (ensayo de inmunoensayo de microperlas multiplexadas)(Reboul et al., 2020). La técnica CLIA, permite determinar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos (IgM / IgG) contra *B. burgdorferi*. En este caso la enzima acoplada al anticuerpo cataliza una reacción quimioluminiscente, emitiendo fotones detectados en un fotomultiplicador (Ledue et al., 2008). Por su parte las aplicaciones basadas en la tecnología MMIA están logrando grandes avances a nivel diagnóstico, se emplean microperlas recubiertas con antígenos de *Borrelia* para detectar Ac específicos y la señal se mide mediante recuento de microesferas fluorescentes (Krishnan et al., 2018).

5.1.3 Western blot o Inmunoblot

Esta prueba de segundo nivel es empleada para confirmar resultados positivos o indeterminados de las muestras analizadas por ELISA o IFA, permitiendo detectar anticuerpos frente a un conjunto de proteínas antigénicas de *B. burgdorferi* preseleccionados (Borchers et al., 2015; Moore et al., 2016). Los kits comerciales más empleados en la detección de *Borrelia*, usan electroforesis para separar antígenos de muestras positivas conocidas que se fijan sobre un soporte sólido de nitrocelulosa, que se pondrá en contacto con las muestras de suero, donde los anticuerpos específicos de *Borrelia* presentes se unirán al Ag, formando el complejo Ag-Ac (Cook et al., 2016). Se emplean anticuerpos anti-IgG o anti-IgM conjugados a una enzima para revelar la reacción al adicionar el sustrato cromogénico (Mahmood et al., 2012). Es recomendable que la selección de especies de *Borrelia* para la extracción de antígenos sea de cepas locales. Se ha demostrado que, en comparación con los kits comerciales, son significativamente más sensibles (Figura 8) (Cook et al., 2016). En Europa se emplea la cepa *B. afzelii* Pko (Talagrand-Reboul et al., 2020).

La probabilidad de detección de bandas específicas varía de un mínimo de 0% a un máximo de 68% (Cook et al., 2016). Para su interpretación se emplean criterios estandarizados: en la interpretación positiva de la prueba de IgG se requieren de 2 a 3 bandas presentes y en la interpretación positiva de la prueba de IgM, de 5 a 10 bandas (Best et al., 2019). Los resultados se deben analizar de forma adecuada. La identificación de las bandas resulta compleja, debido a la dificultad de distinguir reactividades específicas y no específicas de antígenos con pesos moleculares similares. Por ejemplo, algunos Ag suelen presentar reacción cruzada con Ag no borreliales; tal es el caso de la banda de 41 kDa, indicativo de reactividad contra la proteína flagelina de *B. burgdorferi*, que a su vez reacciona de forma cruzada con otras proteínas flagelares bacterianas (Moore et al., 2016). El empleo de Western Blot como prueba de segundo nivel, funciona bien en pacientes con manifestaciones clínicas tardías, principalmente con artritis de Lyme y neuroborreliosis, por sus elevados niveles de IgG frente a los antígenos de *Borrelia*, siendo el caso contrario en pacientes con EM que depende en gran medida de la respuesta IgM, sin embargo la mala interpretación de las transferencias de IgM en los primeros meses de la enfermedad limitan su uso, al ser responsables del sobrediagnóstico de BL (Branda et al., 2010).

En la actualidad las técnicas de tercera generación han incorporado la banda recombinante VlsE a los ensayos de WB, mejorando el rendimiento en los estadios tempranos de la infección por *B. burgdorferi* s.l. VlsE (variable major protein-like sequence, expressed), es una lipoproteína de 35 kDa formada por la alternancia de 6 secuencias variables y 6 secuencias constantes, empleada para aumentar la sensibilidad de 40 a 60% en EM (Portillo et al., 2014)

Investigadores del Departamento de Enfermedades Infecciosas del CIBIR, analizaron las pruebas de inmunotransferencia (EurolineWB, Euroimmun), realizadas a sus pacientes con BL, observando la presencia de la banda antigénica recombinante VlsE en el 89,7% de los casos, seguida de la banda VlsE + p17 (42,3%) y en los pacientes en los que estuvo ausente la banda VlsE, se visualizaron las bandas p30 y p31 combinadas entre ellas o con otras bandas específicas de *B. burgdorferi* s.l. (Portillo et al., 2014).

Para las técnicas de inmunotransferencia, es necesario un personal cualificado, con habilidad en la preparación del antígeno, en el procedimiento y la interpretación del resultado. Aunque la automatización ha permitido optimizar la técnica, se lograría un mejor rendimiento al estandarizar los antígenos empleados (Talagrand-Reboul et al., 2020). Por su parte el consenso internacional para la interpretación de los métodos de dos niveles, indica que existe un falso positivo, si el paciente presenta un resultado de IgM positivo después de 6 semanas del inicio de la infección. La ausencia de IgG en la etapa diseminada tardía debe tomarse como falso negativo e inducir al médico en la realización de un diagnóstico diferencial. Además, aunque persistan altos niveles de anticuerpos después de alcanzar la remisión completa, el paciente no debería seguir recibiendo terapia antimicrobiana y no es recomendable el uso de los métodos serológicos para su seguimiento (C Eldin et al., 2018).

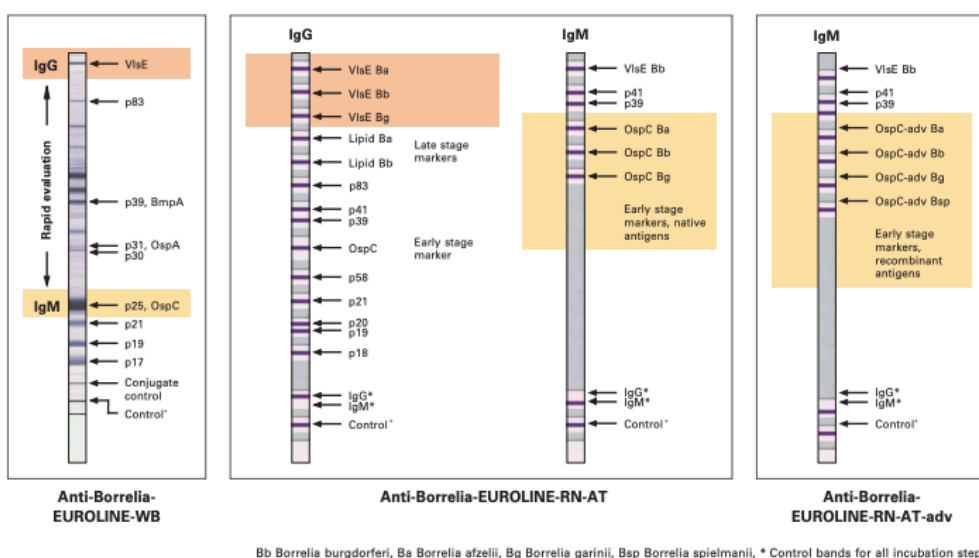


Figura 8. Prueba confirmatoria para la detección de anticuerpos IgM frente a *Borrelia burgdorferi* sensu lato (EUROIMMUN AG, Alemania).

La prueba Anti-Borrelia EUROLINE-WB, emplea extracto de antígeno completo de *Borrelia afzelii* junto con un chip de membrana que contiene VlsE recombinante como marcador de enfermedad en etapa temprana (independientemente de la especie) y permite la identificación de reacciones atípicas y asegura una alta sensibilidad. La presencia de un VlsE positivo (IgG) o una banda de antígeno p25 / OspC (IgM) permite una evaluación rápida.

El Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT incluye marcadores serológicos de fase precoz OspC y VlsE de diferentes geno-especies, p39 (Bmp) –altamente específico- y el marcador de fase tardía p83. Además, contiene lípidos inmunogénicos nativos y antígenos específicos producidos mediante diseño molecular y análisis bioinformático del genoma de *Borrelia*.

El Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT-adv contiene un dímero de OspC recombinante de las geno-especies patógenas más relevantes y de *Borrelia spielmanii*. Dicho antígeno presenta la misma sensibilidad que el OspC nativo con un 30% más de especificidad que el antígeno OspC recombinante convencional.

5.1.4 Determinación de C6

El ensayo de ELISA C₆ se basa en el antígeno peptídico sintético inmunodominante C₆, que es la porción invariable de la región 6 (IR₆) de la lipoproteína de la superficie externa VlsE de *B. garinii*. IR₆ está altamente conservada entre las especies *B. afzelii* y *B. garinii*; sin embargo, presenta diferencias de hasta 5 aminoácidos con la proteína VlsE de *B. burgdorferi* B31. Se sabe que los sueros de pacientes europeos con BL contienen anticuerpos frente al péptido C₆. Así, en Europa se han utilizado ensayos con péptido C₆ para analizar sueros de 23 pacientes con EM confirmado por cultivo y de 41 pacientes con manifestaciones tardías de BL (ACA y neuroborreliosis tardía), presentando reactividad C₆ en 20 de 23 (87%) sueros de pacientes con EM, en 20 de 21 (95%) sueros de pacientes con ACA, y en 14 de 20 (70%) sueros de pacientes con neuroborreliosis tardía (Aguero-Rosenfeld et al., 2005). No obstante, la especificidad de IR₆ es variable según la especie de *Borrelia* infectante y las manifestaciones de la enfermedad (Sillanpää et al., 2007). Se ha visto que la sensibilidad del C₆ supera la de VlsE en pacientes con EM (positividad de IgG en hasta 90% versus 63%); sin embargo, el VlsE puede detectar anticuerpos de pacientes con neuroborreliosis con más frecuencia que C₆ (Aguero-Rosenfeld et al., 2005).

En otro estudio que analizó muestras de pacientes con EM (n= 93) o enfermedad diseminada temprana (n= 27), tratados con antibióticos y de remisión completa, observaron una disminución ≥ 4 veces en el título de anticuerpos C₆ con respecto a una muestra tomada al inicio del estudio para todos los pacientes con EM múltiple y en el 89% de los pacientes con EM único. Estos resultados indican que una disminución en el título de anticuerpos anti-C₆ coincide con una terapia antimicrobiana efectiva en pacientes con BL localizada o diseminada tempranamente (Philipp et al., 2005)

Algunos autores han planteado sustituir la inmunotransferencia (técnica cara y subjetiva en ocasiones) por un ensayo de ELISA C₆ como prueba de segundo nivel, mostrando buena concordancia en cuanto a rentabilidad (Portillo et al., 2006), por lo que se planteó como una herramienta alternativa al protocolo en dos niveles para el serodiagnóstico de la BL. De acuerdo con algunos autores,

la sensibilidad al emplear la estrategia serológica en dos pasos es comparable a la de investigaciones que consideran el uso de C6 como única prueba diagnóstica, reduciendo los inconvenientes de la inmunotransferencia, aunque parece ser menos específica (Cinco et al., 2006; Smismans et al., 2006; Ledue et al., 2008; Branda et al., 2010; Branda et al., 2011; Zannoli et al., 2020).

5.2 Limitaciones del Diagnóstico Serológico

5.2.1 Manifestaciones clínicas y estado inmune del paciente.

Existe variabilidad en los valores de sensibilidad y especificidad según la etapa de la enfermedad. El EM está asociado a una respuesta humoral baja y las pruebas serológicas en el 50% de los casos son negativas, su diagnóstico es clínico. En caso de una manifestación atípica, se recomienda el cultivo o PCR a partir de biopsias de la lesión para diagnosticar la infección por *B. burgdorferi* s.l. (Stanek et al., 2011). En la neuroborreliosis es necesario el análisis conjunto de muestras de sangre y LCR. En suero hay una sensibilidad del 70-89% en fase aguda mientras que en LCR la sensibilidad es mayor del 90%. El diagnóstico debe acompañarse de pleocitosis linfocítica y la presencia de anticuerpos IgG específicos sintetizados intratecalmente (Ogrinc et al., 2016). Por su parte la artritis de Lyme y la ACA presentan una sensibilidad del 95% y 98%, respectivamente (Leefflang et al., 2016). En la artritis, pese a tener altos niveles de Ac IgG contra *B. burgdorferi* s.l. la serología positiva por sí sola no es suficiente para su confirmación; por ejemplo, los valores de la proteína C reactiva y la velocidad de sedimentación globular normales son de apoyo al diagnóstico (Stanek et al., 2011).

5.2.2 Valor predictivo de las pruebas

Es evidente que el diagnóstico serológico está indicado en todos los casos de sospecha clínica de BL excepto EM, aunque la variabilidad de manifestaciones clínicas y la aparición de síntomas inespecíficos disminuyen el valor predictivo de los métodos serológicos (Leefflang et al., 2016). La probabilidad de que un paciente con una prueba serológica positiva realmente tenga BL (valor predictivo positivo) y la probabilidad de que un paciente con una prueba negativa no tenga la enfermedad (valor predictivo negativo) depende de las características de rendimiento del método (sensibilidad y especificidad) y de la prevalencia de la

enfermedad en la población (Leeflang et al., 2016; Carole Eldin et al., 2019). Con una prueba serológica de dos niveles de especificidad y sensibilidad del 95%, la probabilidad de un resultado negativo para alguien que sufre de BL diseminada sería muy baja (0.05 y 0.58%) (Talagrand-Reboul et al., 2020). Un resultado serológico negativo ante síntomas y signos propios de la enfermedad pone en duda el método serológico empleado (Leeflang et al., 2016). De la misma manera en las pruebas positivas sólo el 16% de las personas seropositivas evaluadas con síntomas inespecíficos tendrían BL (Talagrand-Reboul et al., 2020).

En la BL diseminada es raro obtener resultados negativos, sin embargo, suele presentarse en pacientes profundamente inmunocomprometidos o aquellos que han recibido una terapia con antibióticos al inicio de la enfermedad, afectando la seroconversión. Esto se demostró en un estudio en pacientes con manifestaciones clínicas de BL y picadura previa de la garrapata con resultado serológico negativo, en el que el 70% había recibido tratamiento profiláctico con antibióticos (Aucott et al., 2009).

Las principales dificultades relacionadas con resultados falsos negativos o falsos positivos incluyen la adopción de niveles de corte inadecuados, la presencia de anticuerpos de reacción cruzada, reacciones positivas por enfermedades autoinmunes y criterios de interpretación inapropiados en inmunotransferencia (Dessau et al., 2013).

5.2.3 Reacciones cruzadas

Son diversas las reacciones cruzadas que se han descrito en el empleo de las pruebas serológicas, tanto con otras espiroquetas (agentes de fiebre recurrente de *Borrelia*, *Treponema pallidum*, *Leptospira interrogans* y treponemas orales en sujetos con gingivitis o enfermedades periodontales), como con microorganismos asociados a endocarditis bacteriana, microorganismos asociados otras enfermedades transmitidas por garrapatas (*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*) o infecciones virales (virus Epstein-Barr, Parvovirus B19, VIH) (Talagrand-Reboul et al., 2020). También las reacciones autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple tienden a generar falsos positivos. Cuando se obtiene una

serología positiva en pacientes de zonas endémicas de los casos anteriormente descritos, es fundamental descartar la reactividad cruzada antes de evaluar su resultado (Meléndez et al., 2014).

Algunos estudios que compararon la reactividad de sueros de pacientes con enfermedades potencialmente reactivas empleando tres tipos diferentes de pruebas serológicas, observaron que las tasas de reacción cruzada fueron más altas para un ELISA basado en lisado de células enteras (27%) y para una técnica inmunoenzimática (EIA) recombinante DbpA-OspC IgM (15%) que para una IgG VlsE-DbpA-OspC (3%). En la prueba de EIA IgM recombinante, se observó la tasa más alta de reacciones cruzadas en sífilis, artritis reumatoide y mononucleosis infecciosa (Molins et al., 2017). Se ha demostrado que las pruebas de IgM EIA generan falsos positivos en enfermedades de reacción cruzada, independientemente del tipo de ensayo (Talagrand-Reboul et al., 2020).

5.2.4 Periodo de ventana seronegativa

Tras la picadura de la garrapata, el sistema inmune desencadena una respuesta inmunológica, aunque en la mayoría de los casos, los niveles de anticuerpos no alcanzan concentraciones detectables hasta la etapa diseminada de la enfermedad. El EM aparece generalmente entre 2 y 30 días y la seroconversión ocurre después de 2 a 4 semanas (Talagrand-Reboul et al., 2020). Un estudio reciente mostró que las pruebas serológicas para BL presentaban una sensibilidad heterogénea, según la etapa de la enfermedad: 50% (IC 95% = 40-61%) para EM localizada, 77% (IC 95% = 67-85%) para la neuroborreliosis, confirmando que es necesario tener en cuenta el periodo de ventana seronegativa en el diagnóstico de BL, debido a que los resultados negativos en etapa temprana no son excluyentes de la enfermedad (Leeftang et al; 2016).

5.2.5 Seropositividad y Reinfección

Una serología positiva no implica necesariamente una infección activa, puede ser resultado de una exposición previa a *B. burgdorferi* s.l., los Ac IgG e IgM pueden persistir durante meses o incluso años, tanto en pacientes sintomáticos como aquellos sin manifestaciones clínicas evidentes, por lo tanto, las pruebas serológicas no pueden usarse como biomarcadores para la infección activa, y

mucho menos para controlar la efectividad del tratamiento. La presencia de IgM no es indicativa de una infección persistente (Markowicz & Stanek, 2018; Carole Eldin et al., 2019).

Esta persistencia de anticuerpos tras la remisión clínica se convierte en una dificultad al momento de diagnosticar posibles reinfecciones en el paciente (Talagrand-Reboul et al., 2020). Cuando se sospecha de reinfección es necesario tener en cuenta información esencial del historial médico, e identificar el EM. En caso no presentar EM, se recomienda realizar análisis serológicos en fase aguda y fase convaleciente para detectar un aumento en el título de ELISA o un aumento en el número de bandas de anticuerpos que podrían indicar infección activa (Moore et al., 2016).

6. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS NO VALIDADAS

Actualmente se desarrollan ensayos biológicos alternativos que permitan mejorar el diagnóstico y seguimiento de la BL temprana y tardía, incluso para individuos con síntomas no específicos (Raffetin et al., 2019). El uso de estas pruebas ha sido cuestionado al no haberse evaluado de forma suficiente su utilidad en el diagnóstico, además de la dificultad de estandarizar y tener sensibilidad, especificidad y reproducibilidad heterogénea (Best et al., 2019).

Según un estudio reciente, estos ensayos se agrupan en pruebas que exploran respuestas inflamatorias y autoinmunes: (CXCL-13, CCL-19, Apolipoproteína B-100), son precisas, pero necesitan una mejor definición del punto de corte y estandarización, pruebas que exploran la inmunidad celular [prueba de transformación de linfocitos, ELISpot -interferón- γ (IFN- γ), IFN-alfa, células CD57 + NK]: son pruebas dudosas, por falta de estudios que soporten su desempeño y pruebas microbiológicas directas, que incluyen xenodiagnóstico, microscopía y detección de proteínas de membrana OspA (Raffetin et al., 2019).

6.1 Pruebas de evaluación de la respuesta inflamatoria y autoinmune

Durante la BL aguda se produce un incremento de mediadores inflamatorios, liberados principalmente para promover la migración de células inmunes del huésped hacia los sitios de infección, principalmente linfocitos B y T y células dendríticas durante la respuesta inmune activa frente a *B. burgdorferi* s.l. En ese sentido, la determinación de los niveles séricos o en LCR de mediadores inmunes en la sangre podrían ser un indicador del estado de la respuesta inmunológica del paciente o de la disminución de la inflamación y con las manifestaciones específicas de la enfermedad (Aucott et al., 2016).

6.1.1 CXCL-13

Estudios recientes han sugerido un papel importante de la quimiocina CXCL-13, un quimioatrayente selectivo de los linfocitos B producida por las células presentadoras de antígenos residentes en el SNC y detectables en el LCR durante la neuroborreliosis aguda, promoviendo la migración de células B hacia el SNC, resultando en pleocitosis de LCR con aumento de linfocitos B hasta un 80% (Gudowska-Sawczuk et al., 2020; Talagrand-Reboul et al., 2020).

La determinación de la producción intratecal de anticuerpos específicos de *B. burgdorferi* s.l. (ITAc), se considera el marcador diagnóstico más específico de la neuroborreliosis. Sin embargo, su aplicación en la infección temprana está limitada por la detección tardía de anticuerpos y además su presencia continúa hasta varios años, a pesar de la culminación de un tratamiento exitoso (Eckman et al., 2020).

La producción intratecal de CXCL-13 e IgG están estrechamente relacionadas, durante la neuroborreliosis. Sin embargo, el incremento de la concentración de CXCL-13 en el LCR ocurre al inicio de la neuroborreliosis, antes de que se produzca la síntesis de anticuerpos intratecal contra *B. burgdorferi* s.l., lo que indica que CXCL-13 podría ser útil para evaluar pacientes con síntomas clínicos típicos tempranos, pleocitosis en LCR y un índice de anticuerpos específicos negativo, para diferenciar aquellos pacientes con infección activa *versus* los pacientes tratados, para casos de reinfección y diferenciar neuroborreliosis activa definida por ITAc de otros trastornos de neuroinflamatorios (Eckman et al.,

2020). Esta posible utilidad se ve limitada, debido a que los niveles elevados de CXCL-13 no son específicos de neuroborreliosis, también están asociados a individuos sanos con trastornos de SNC y a enfermedades que cursan con pleocitosis en LCR. Por lo tanto, CXCL-13 no reemplaza la utilidad diagnóstica de la punción lumbar en las enfermedades del SNC (Gudowska-Sawczuk et al., 2020).

Varios estudios han demostrado que los niveles altos en LCR de la quimiocina CXCL-13 son un biomarcador temprano, sensible y específico para el diagnóstico de neuroborreliosis aguda no tratada con una sensibilidad del 94-100% y una especificidad del 93-100% (Knudtzen et al., 2020; Lintner et al., 2020; Wagner et al., 2018). A pesar de la evidencia disponible sobre el papel de CXCL-13 en el diagnóstico de neuroborreliosis, su implementación diagnóstica aún es controvertida, debido a que la neuroinflamación en la activación inmune del SNC, no es exclusiva de neuroborreliosis (Gudowska-Sawczuk et al., 2020). Aunque los datos sobre el incremento de CXCL13 en otras patologías son escasos, existe evidencia de elevaciones moderadas a altas de CXCL13 en el LCR en enfermedades que cursan con neuroinflamación, como la neurosífilis, criptococosis, tripanosomiasis, meningitis viral, meningoencefalitis, linfoma del SNC, esclerosis múltiple y encefalitis autoinmune (Pilz et al., 2019).

6.1.2 CCL-19

La quimiocina (motivo CC) ligando 19 (CCL-19), es producida en gran parte por las células del estroma reticular localizadas en los tejidos linfoides secundarios y funciona como un quimioatrayente de los linfocitos T CCR7⁺, las células B y las células dendríticas para establecer un microambiente óptimo para la generación de respuesta inmune (Comerford et al., 2013). El estudio de los niveles séricos de los mediadores inflamatorios, en una cohorte de pacientes con BL aguda, demostró que los niveles de CCL-19 se elevaron y retornaron a valores basales de control de referencia después del tratamiento y la resolución de la enfermedad (Soloski et al., 2014).

En un estudio de cohorte post-tratamiento realizado por Aucott et al. (2016), se demostró que los niveles de CCL-19 son un factor de riesgo inmunológico para el PTLDS; de los 76 pacientes evaluados, se observó en aquellos que desarrollaron PTLDS (14.5%), una asociación entre los síntomas persistentes y funcionalmente significativos con niveles persistentemente elevados de CCL-19 a los 6 y 12 meses después del tratamiento (Aucott et al., 2016).

La evidencia actual indica que los niveles de CCL-19 se encuentran significativamente elevados en suero durante la infección aguda al momento del diagnóstico, retornando a los niveles normales después del tratamiento, la resolución del EM y la recuperación. La persistencia de los niveles elevados después de completar la terapia con antibióticos, puede ser indicativo del riesgo a desarrollar PTLDS (Aucott et al., 2016)

6.1.3 Apolipoproteína B-100

El desarrollo de la autoinmunidad inducida por la infección en la BL es un mecanismo que contribuye a la persistencia de la artritis de Lyme. Aunque en la mayoría de los pacientes se resuelve con tratamiento antibiótico oral o intravenosa, en algunos casos presentan sinovitis persistente durante meses o años después del tratamiento con antibióticos y se conoce como artritis de Lyme resistente a antibióticos (Crowley et al., 2015). A medida que la infección progresa, las respuestas de anticuerpos IgG contra *B. burgdorferi* se expande gradualmente a un conjunto creciente de proteínas de *B. burgdorferi* y del huésped, denominadas autoantígenos, que pueden persistir después de la infección inicial y servir como inmunógenos, lo que contribuye a la inflamación articular excesiva mucho después de que las espiroquetas hayan muerto (Sulka et al., 2018).

Las cepas altamente inflamatorias de *B. burgdorferi* se asocian comúnmente con artritis de Lyme resistente a antibióticos, a través de los mecanismos de desregulación inmune mencionados anteriormente. Se ha propuesto a la apolipoproteína B 100 (Apo B-100) como autoantígeno asociado con la respuesta autoinmune en pacientes con artritis de Lyme postinfecciosa. La presencia de colesterol en la membrana de *B. burgdorferi* permite la formación

de balsas lipídicas y una organización ultraestructural similar entre la espiroqueta y el huésped. Los anticuerpos contra los glicolípidos espiroquetales podrían reaccionar de forma cruzada con epítomos similares en Apo B-100. Si una respuesta autoinmune a Apo B-100 fuera patógena, las células T CD4⁺ reactivas a Apo B-100 probablemente ayudarían a las células B a producir autoanticuerpos anti Apo B-100 (Crowley et al., 2015; Sulka et al., 2018).

Hasta el momento los estudios realizados no muestran datos confiables de sensibilidad y especificidad. Crowley et al. (2015), en diferentes investigaciones demostraron niveles elevados de Apo B-100 en pacientes con artritis de Lyme resistente a antibióticos, comparados con el grupo control y una respuesta de anticuerpos IgG anti ApoB significativamente mayor a la Apo B-100 en comparación con controles sanos y pacientes con EM (Crowley et al., 2014; Crowley et al., 2015; Strle et al., 2017).

6.2 Pruebas de evaluación de Inmunidad Celular

6.2.1 Pruebas de transformación de linfocitos (LTT)

Esta prueba permite evaluar la respuesta linfoproliferativa de las células mononucleares de sangre periférica a los antígenos de *B. burgdorferi*. Los resultados se expresan como un índice de estimulación (SI), con SI > 10 considerado positivo y SI < 10 considerado negativo (Raffetin et al., 2019)

Las pruebas de transformación de linfocitos se recomiendan solo en el caso de un cuadro clínico indefinido de borreliosis acompañado de la serología negativa, siendo aparentemente útil para la indicación del inicio del tratamiento antimicrobiano (Baehr et al., 2012). En una investigación que evalúa esta prueba, se establece una sensibilidad de 89,6% y la especificidad de aproximadamente el 98,7% en la borreliosis clínica seropositiva antes de la terapia con antibióticos. Estos valores disminuyen tras del tratamiento. Además, en este estudio lograron definir a OspC (p25) como el antígeno adecuado para esta prueba (Baehr et al., 2012).

En la actualidad se encuentra en el mercado el LTT-MELISA, que es un LTT modificado, que permite detectar la respuesta inmune de las células T a antígenos recombinantes específicos de *Borrelia*, mediante la incorporación de H-timidina, Puri et al. (2014), evaluaron su utilidad en términos de sensibilidad y especificidad y sugieren su utilidad en la confirmación de la BL activa, así como en pacientes cuya serología es inespecífica (Puri et al., 2014).

6.2.2 IFN- γ ELISpot

La respuesta del huésped ante la infección por *B. burgdorferi* implica la activación tanto de la inmunidad humoral mediada por células B, como la inmunidad celular mediada por células T. Aunque la detección de la respuesta específica de anticuerpos IgG/IgM es el método diagnóstico convencional para la BL, la evaluación de la inmunidad celular podría ofrecer una alternativa diagnóstica con mayor sensibilidad (Jin et al., 2013).

El ensayo de puntos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISpot), es una técnica tanto cuantitativa como cualitativa, que permite evaluar la inmunidad de las células T en función de su producción de citocinas (Figura 9). Su sensibilidad para detectar células T productoras de citocinas es de 20 a 200 veces mayor que la de ELISA o la tinción intracelular basada en citometría de flujo. El IFN- γ liberado por las células en respuesta al antígeno de *Borrelia* unido a un anticuerpo anti-IFN- γ , puede mapearse a nivel de una única célula y así calcular la frecuencia de células T respondedoras (Jin et al., 2013).

En un estudio clínico con una cohorte de pacientes positivos para *Borrelia* y controles sanos, evaluaron la utilidad de ELISpot convencional frente a un nuevo método conocido como iSpot Lyme. Se determinó que tanto ELISpot como iSpot Lyme son altamente sensibles en la detección de inmunidad específica de células T, incluso aún más sensible y específico que Western Blot. En este estudio iSpot Lyme tuvo una sensibilidad del 84% y una especificidad del 94% en comparación al ELISpot convencional con una sensibilidad del 67% y una especificidad del 76% (Jin et al., 2013).

En un estudio realizado por Gorkom et al., (2020), se evaluó el rendimiento diagnóstico de una técnica comercial LymeSpot, no validada, y la compararon con una técnica ELISpot casera en pacientes con sospecha de neuroborreliosis. Ambas técnicas mostraron un bajo desempeño diagnóstico, con una sensibilidad que oscila entre 44,4-66,7% y especificidad entre 42,0-72,5%, determinando que estos dos ensayos evaluados no pueden emplearse en el diagnóstico de neuroborreliosis o para controlar el éxito del tratamiento con antibiótico (Gorkom et al., 2020).

El método ELISpot resulta de gran utilidad en la etapa temprana de la enfermedad, donde hay respuesta específica de células T, antes de que los Ac sean detectables por ELISA. También es útil en pacientes con terapia antimicrobiana temprana y pacientes con BL crónica. En estos pacientes los títulos de Ac anti-*Borrelia* tienden a disminuir y ser indetectables por ELISA. Su sensibilidad y especificidad lo convierten en un método prometedor para el diagnóstico y seguimiento de la infección por *Borrelia* (Callister et al., 2016).

Actualmente no está validado, su especificidad, los límites y la reproducibilidad requieren más investigaciones que validen su uso. La principal limitación es su variabilidad, los estudios realizados de valoración del rendimiento utilizan distintas cepas, tales como: *B. afzelii*, *B. garinii* y la cepa B31 de *B. burgdorferi* combinada con antígenos específicos para cada una de las cuatro especies (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. bavariensis*), reflejando la falta de reproducibilidad y especificidad de la técnica (Raffetin et al., 2019).

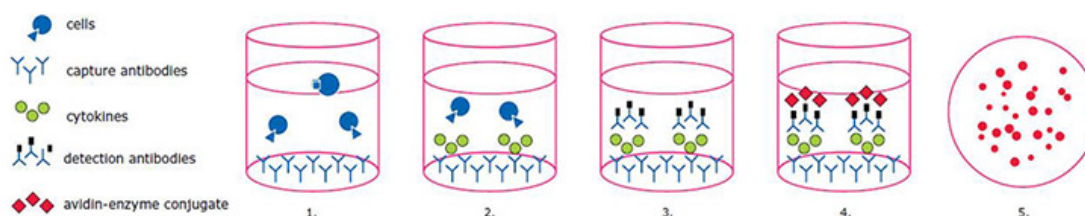


Figura 9. Flujo de trabajo del ensayo ELISpot.

1. Se cubre la membrana con anticuerpo de captura. Se añaden células inmunes y estímulos 2. Las células que responden producen IFN-γ, que se une al Ac 3. Se lavan las células y se agrega un segundo Ac biotinilado específico de IFN-γ, que se une al complejo IFN-γ-Ac. 4 y 5. Se añade el sustrato enzimático. Cada punto dentro de un pozo representa la firma del IFN-γ de una sola célula. Fuente: <https://www.sigmaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-peptides/learning-center/elispot-assay.html>

6.2.3 Interferón alfa (IFN- α)

El Interferón Alfa (IFN- α) surge en la línea de investigación del PTLDS. Al parecer los diferentes mecanismos biológicos involucrados en la fisiopatología de la infección, *B. burgdorferi* es capaz de modular la expresión de diferentes genes en el huésped, involucrados en la respuesta inmune ante el patógeno, incluyendo al IFN- α , una citocina proinflamatoria, involucrada en amplio espectro de efectos en la respuesta a la infección por patógenos, incluidas las bacterias como *Borrelia* (Kovarik et al., 2016).

Petzke et al., (2016) establecieron en un modelo murino de la BL, una asociación positiva entre la capacidad de diseminación de *B. burgdorferi* y la inducción temprana de IFN- α (Petzke et al., 2016).

En un estudio realizado por Jacek et al., (2013) los niveles de IFN- α fueron elevados en pacientes con PTLDS en comparación no solo con individuos sanos, sino también en pacientes con antecedentes de BL. Además, se ha establecido que la elevación de interferón alfa está asociada con deterioro neurocognitivo tanto en modelos animales como en humanos. Una hipótesis es que la actividad alta de IFN- α en pacientes con PTLDS puede estar relacionada con factores de susceptibilidad genética, como ocurre en otras enfermedades autoinmunes, que contribuye a la persistencia de los síntomas. Hasta la fecha, en relación a esta hipótesis no se han reportado datos confirmatorios. Además, se requieren más estudios para evaluar la confiabilidad de esta prueba (Jacek et al., 2013).

6.2.4 Recuento de células CD57⁺ NK

Se ha propuesto que los pacientes con PTLDS cursan con un número bajo de recuentos celulares de células asesinas naturales (NK) que expresan el marcador celular CD57⁺. Dado que la disminución en la subpoblación de células CD57⁺ predomina en todos los pacientes antes del inicio de la terapia con antibióticos y los niveles de CD57⁺ parecen correlacionarse con la mejoría clínica o el fracaso terapéutico en estos pacientes (Nielsen, White, Goodier, & Riley, 2013). Por lo tanto, el recuento de la cantidad del subconjunto CD57⁺ NK, podría emplearse como un método inmunológico alternativo para la detección de la BL y los cambios en el número de células CD57⁺ se pueden emplear como indicador

de respuesta al tratamiento. El papel del subconjunto de linfocitos CD57+ en la evolución clínica BL, es un campo que requiere mayor investigación (Alby et al., 2015; Moore et al., 2016). La evidencia disponible sobre su rendimiento analítico es escasa y demuestra que tienen una especificidad demasiado baja (Nielsen et al., 2013).

Diversas investigaciones han evaluado el empleo de CD57+ como marcador en el seguimiento al tratamiento de pacientes con BL en estado crónico, aunque en la mayoría de ellas presentan sesgos, como el bajo número de pacientes incluidos, no realizan repetición de la prueba en los mismos pacientes para seguir la cinética de expresión de CD57, no incluye grupos control validados, además no informan los valores de CD57 antes del tratamiento. Es claro que carece de investigaciones que sustenten el rendimiento de la prueba en cuanto a sensibilidad y especificidad (Raffetin et al., 2019).

6.3 Pruebas Microbiológicas Directas

6.3.1 Xenodiagnóstico

Los pacientes con BL en su mayoría alcanzan la remisión de la enfermedad tras un tratamiento exitoso, sin embargo, un porcentaje muy bajo presenta PTLDS (Embers et al., 2017), en los que no existe evidencia de la detección de la infección en curso por PCR, cultivo e incluso los métodos más empleados en la detección anticuerpos no logran determinar la eliminación exitosa de *Borrelia* en el paciente (Marques et al., 2014). El uso de modelos animales ha proporcionado resultados clave sobre la infectividad del patógeno y las respuestas del huésped a la infección. Sin embargo, solo ofrecen la capacidad de controlar la infección con un solo patógeno bien definido y examinar las respuestas que dependerán del huésped. En la infección en el ser humano existen condiciones genéticas difíciles de replicar en animales (Embers et al., 2017).

Se han empleado ratones, cobayas, perros, conejos y monos para analizar la infección por *B. burgdorferi*, siendo el Macacos Rhesus el mejor modelo experimental para examinar la persistencia de la infección posterior al tratamiento y la enfermedad asociada. Macacos Rhesus ha presentado los signos característicos de las tres fases de la BL, además de similitudes entre los

datos farmacocinéticas disponibles para ceftriaxona y doxiciclina (Embers et al., 2012, 2017). En un estudio realizado en Macacos Rhesus para evaluar la eficacia del tratamiento con ceftriaxona y / o doxiciclina luego de la infección con *B. burgdorferi*, lograron recuperar pequeñas cantidades de espiroquetas viables por xenodiagnóstico. Demostrando que *B. burgdorferi* puede resistir el tratamiento con antibióticos, administrado después de la diseminación, en un huésped de primates. Aunque se sabe que *B. burgdorferi* no posee mecanismos de resistencia y es susceptible a los antibióticos como la doxiciclina y la ceftriaxona, *in vitro*, parece volverse resistente (Embers et al., 2012).

El modelo de ratones de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) permite estudiar la supervivencia a largo plazo o la desaparición de *B. burgdorferi* no cultivable. Siendo variables las manifestaciones clínicas de la enfermedad, dependen de la cepa del ratón y su edad, sin poder reproducir en ellos la diseminación temprana y tardía de la BL (Embers et al., 2017). Un estudio publicado por Hodzic et al., (2014) demostró la presencia de *B. burgdorferi* 12 meses después del tratamiento con ceftriaxona en el modelo de ratón C3H, reforzando la idea de la presencia de espiroquetas no cultivables aun después del tratamiento. Se cree que la deficiencia del aislamiento de *B. burgdorferi* se debe a la atenuación genética generada por la pérdida de plásmidos (Hodzic et al., 2014).

Ante los datos inconsistentes de la presencia de *B. burgdorferi* en pacientes con PTLDS, un estudio empleó larvas de *I. scapularis* para el xenodiagnóstico de la infección por *B. burgdorferi* en 36 humanos permitiéndoles alimentarse de ellos hasta su reposición. Obtuvieron 16 pacientes con PTLDS con resultando negativo y con niveles altos de C6 después del tratamiento. También fue negativo en 5 pacientes con EM al finalizar su tratamiento. Únicamente resultó positivo para 1 paciente con EM y 1 paciente con PTLDS. Sin datos claros en la viabilidad de las espiroquetas en estos pacientes, establecen que el xenodiagnóstico se puede utilizar de manera segura y tiene potencial para ampliar el conocimiento de la biología de *Borrelia* en humanos (Marques et al., 2014).

Los inconvenientes principales de estos estudios incluyen la posibilidad de infección por el método de inoculación con aguja, inoculaciones con concentraciones altas de espiroquetas cultivadas y la incapacidad de replicar la farmacocinética de antibiótico y la variabilidad de manifestaciones clínicas que presentan los humanos (Embers et al., 2017).

6.3.2 Microscopía

La utilidad de la detección directa de *B. burgdorferi* s.l. por microscopia, presenta serias dificultades. En la actualidad, la detección directa de este microorganismo por microscopía solo se puede utilizar con fines de investigación y para el control del crecimiento en los cultivos. Debido a que su desempeño en el diagnóstico clínico se ve afectado por la baja cantidad de bacterias en las lesiones cutáneas, así como en LCR o muestras de líquido sinovial, alcanzando solo un 41% de sensibilidad analítica. Además, entre los requerimientos técnicos, es necesario incluir controles positivos/negativos, requiere de profesionales altamente capacitados y con la experiencia en la lectura al microscopio según la técnica empleada (Raffetin et al., 2019).

Con el mejoramiento de la capacidad de recuperación en cultivo de *B. burgdorferi* s.l. a partir de diferentes tipos de muestras, la sensibilidad diagnóstica de la detección microscópica se puede aumentar a más del 70% (Cook & Puri, 2016). La detección morfológica se puede realizar con preparaciones no teñidas, en fondo oscuro, o teñidas. En este caso pueden ser fluorescentes (con anticuerpos monoclonales o con naranja de acridina) y no fluorescentes, por impregnación con plata; mediante microscopía de campo oscuro, microscopía electrónica, la tinción de plata con microscopía óptica y la microscopía de enfoque flotante (MacDonald, 2013).

El protocolo de microscopía de campo oscuro modificada (LM method), se ha propuesto para la detección directa de *B. burgdorferi* s.l., sin embargo, en una evaluación clínica reciente del método LM, las estructuras identificadas como *Borrelia* no pudieron ser confirmadas por PCR y se determinó que el método era inválido. Por tanto, el método LM no debe usarse para el diagnóstico de BL (Lohr et al., 2018).

6.3.3 Detección de proteínas de membrana OspA

La proteína A de la superficie externa (OspA), es una lipoproteína de *B. burgdorferi*. Se considera una adhesina importante para retener las espiroquetas en el intestino medio de la garrapata hasta su alimentación (Tilly et al., 2008). Utpal pal et al.,(2004) en un estudio genético demostraron que la proteína del intestino medio TROSPA es un receptor para la unión a OspA, cuya presencia aumenta la colonización por *B. burgdorferi* (Pal et al., 2004).

Los síntomas inespecíficos de BL en la etapa temprana, acompañados de una serología negativa o ambigua, son razones que sustentan la búsqueda de métodos diagnósticos, que detecten y logren prevenir las etapas diseminadas de la enfermedad. Ante esta necesidad, Magni et al., (2015), evaluaron OspA en la etapa inicial de BL, en muestras de orina. Utilizando para ello una plataforma de nanotecnología basada en partículas Nanotrap, para lograr una alta sensibilidad, junto con un anticuerpo monoclonal anti-OspA que reconoce la región C-terminal de OspA, altamente conservada entre las especies de *Borrelia*. Como resultado observaron una fuerte relación de la eliminación de OspA en orina, de pacientes en la primera etapa BL que resulto negativa luego del tratamiento antimicrobiano. A pesar de demostrar una especificidad de 87,5%, es necesario la realización de más investigaciones que sustenten su uso (Magni et al., 2015).

Otras investigaciones han demostrado una relación entre las concentraciones séricas de anticuerpos anti-OspA con la gravedad y la duración de la artritis de Lyme. Se han detectado niveles elevados de anticuerpos anti-OspA en suero de pacientes con artritis severa y síntomas neurológicos relacionados con la etapa diseminada (Hsieh et al., 2007).

6.4 Técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Al considerarse *B. burgdorferi* s.l. un microorganismo de crecimiento lento y de naturaleza fastidiosa, muchos laboratorios tratan de superar las desventajas inherentes al cultivo mediante la incorporación de las técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el conjunto de pruebas diagnósticas de rutina de la BL. A pesar de que esta técnica no ha sido estandarizada universalmente u optimizada para el diagnóstico de la BL y los datos que respaldan el tipo de muestra adecuada se limitan a pequeños estudios prospectivos y estudios de validación de PCR (Borchers et al., 2015).

Los métodos moleculares actualmente sirven como pruebas de apoyo diagnóstico en la BL, se utilizan en estudios epidemiológicos, clínicos y evolutivos para el genotipado de *B. burgdorferi* s.l., juegan un papel importante en la detección, identificación y genotipado de especies de *Borrelia* en garrapatas, reservorios y animales infectados experimentalmente. Permiten la detección de coinfección con diferentes especies de *Borrelia* en una muestra particular (garrapatas, reservorios, humanos)(Eshoo et al., 2014; Ružić-Sabljić & Cerar, 2016).

Esta prueba resulta altamente específica en la detección directa de DNA de *B. burgdorferi* en diversas muestras clínicas como; líquido sinovial, tejido de biopsia de piel, sangre y LCR, sin embargo, su sensibilidad suele variar debido a las muestras clínicas analizadas que presentan concentraciones variables de espiroquetas, de acuerdo con la etapa de la infección y por la degradación del DNA durante el transporte, almacenamiento y procesamiento de la muestra (Eldin et al., 2018).

Diversos estudios han demostrado que las muestras más empleadas para el diagnóstico de BL por PCR (LCR y sangre), tienen una tasa de positividad muy baja. En LCR por ejemplo suele tener una sensibilidad del 38% en pacientes con neuroborreliosis temprana, reportando incluso menos sensibilidad en la neuroborreliosis tardía (Moore et al., 2016).

La PCR del líquido sinovial presenta una sensibilidad del 75% en artritis de Lyme, y se emplea junto con otras pruebas para diferenciarla de artritis con un origen distinto. En sangre por su parte tiende a ser específica, pero de baja sensibilidad y con mayor riesgo de contaminación, sin embargo, resulta de gran utilidad en la detección de las nuevas genopecies de *B. miyamotoi* y *B. mayonii* (Moore et al., 2016a). En pacientes con casos de EM atípico con serología negativa y la sospecha clínica sigue siendo alta, está indicada la biopsia de piel para PCR y cultivo, la sensibilidad en estos casos es de aproximadamente el 70% (C. Eldin et al., 2018).

Se pueden usar diferentes formatos de ensayo de PCR para obtener resultados cualitativos (PCR convencional y PCR anidada) o cuantitativos (PCR competitiva y PCR en tiempo real)(Yang et al., 2012). La PCR anidada clásica es superior en sensibilidad y especificidad a una PCR estándar, pero la técnica es mucho más propensa a la contaminación externa del DNA (Ružić-Sabljic t al., 2016).

6.4.1 Genes diana para la detección de *B. burgdorferi* s.l.

Un elemento primordial de los métodos moleculares es la selección de una secuencia de DNA adecuada para amplificar. La diana seleccionada debe ser genéticamente estable y altamente conservada para permitir la detección de todas las especies en el complejo *B. burgdorferi* s.l. (Yang et al., 2012). Numerosos genes de *Borrelia* spp. han sido seleccionados para su detección con fines de investigación, pero otros pocos se han utilizado ampliamente con éxito para la detección *B. burgdorferi* s.l. mediante PCR en muestras clínicas, por ejemplo, los genes cromosómicos (*hbb*, *gen fla*, *p66*, *gen 16S rRNA*, *23S rRNA*, *espacio intergénico 23S – 5S rRNA*, *recA*, *bmpA*) están altamente conservados y pueden ser efectivos cuando se emplean en la detección de *B. burgdorferi* s.l, aunque con menor sensibilidad analítica. Mientras que los genes codificados a nivel plasmídico (*ospA*, *ospB*, *ospC*, *gen dbpA*), a pesar de estar presentes en múltiples copias y ofrecer mayor sensibilidad que los marcadores cromosómicos, la alta variabilidad en estas secuencias limita su utilidad cuando se emplean en la detección de *B. burgdorferi* s.l. y, por lo tanto, la amplificación podría no ocurrir en todas las cepas (Yang et al., 2012). Algunos de los genes diana anteriormente indicados, como el gen 16S rRNA, *ospA*, *fla* y *recA* se

emplean en varios kits de PCR disponibles comercialmente, en su mayoría ensayos de PCR en tiempo real y otros genes tienen un bajo poder discriminatorio para distinguir entre las especies de *Borrelia*, como el gen *fla* empleado en algunos ensayos disponibles comercialmente (Ružić-Sabljić et al., 2016).

6.4.2 Ventajas y limitaciones

Las principales ventajas de los métodos moleculares son la detección directa del agente infeccioso antes de que aparezcan anticuerpos específicos detectables por métodos serológicos, en infección activa, infección temprana, en etapas posteriores de la enfermedad y en casos de sospecha de reinfección, cuando las pruebas serológicas no son confiables porque los anticuerpos persisten durante muchos años después de una infección en muchos pacientes (Lula et al., 2015). En la identificación de las especies de *Borrelia* responsables de la infección, así como la discriminación entre más de una especie de *Borrelia* en infecciones mixtas que pueden esperarse en algunas muestras (Alby et al., 2015; Ružić-Sabljić et al., 2016; Lohr et al., 2018). Las pruebas de PCR pueden ser útiles, en áreas endémicas donde las pruebas serológicas tienen altas tasas de falsos positivos debido a la alta seropositividad de la población basal para los anticuerpos anti *Borrelia* causados por infección subclínica (John & Taege, 2019).

Los métodos moleculares para el diagnóstico de BL tienen una alta especificidad, pero una baja sensibilidad, por múltiples factores, como la ausencia de estandarización en relación con la preparación de la muestra, la selección de genes diana y los métodos de detección molecular empleados. Esto dificulta su incorporación en la rutina diagnóstica (Ružić-Sabljić et al. 2016; Lohr et al., 2018).

La principal limitación con la implementación del diagnóstico molecular en la BL es la relación entre la detección del DNA de *Borrelia* y la presencia de infección activa, debido a que la PCR detecta DNA del patógeno destruido y no distingue entre células vivas y muertas (Ružić-Sabljić et al., 2016). Es decir, puede generar resultados falsos positivos que no necesariamente reflejan el curso y tampoco confirman una enfermedad activa, lo que conduce a una utilidad muy limitada.

Es importante destacar que un resultado negativo de la prueba de PCR no excluye BL (Portillo et al., 2014; Eshoo et al., 2014).

Los métodos diagnósticos basados en PCR no pueden emplearse como herramientas de detección primarias si hay sospecha de BL. La detección molecular directa debe limitarse a pacientes con manifestaciones cutáneas y articulares definidas y en estos casos rara vez son necesarias, dado que puede realizarse fácilmente un diagnóstico clínico si la lesión cutánea característica está presente (EM) (Lohr et al., 2018). Para los pacientes con BL que involucran manifestaciones de la enfermedad distintas a las cutáneas, la sensibilidad de la PCR generalmente es baja, a excepción de los pacientes con artritis de Lyme (Eshoo et al., 2014).

7. CONCLUSIONES

1. En Europa, el serodiagnóstico basado en un enfoque de dos niveles, con ELISA o IFA de células enteras, seguidos de inmunotransferencia (Western Blot o Inmunoblot), es el recomendado para el diagnóstico de BL en el adecuado contexto clínico y epidemiológico, aunque presenta limitaciones.
2. Ante la necesidad de mejorar la especificidad y sensibilidad del diagnóstico de BL, se han diseñado nuevos métodos basados en el uso de antígenos nativos purificados, antígenos recombinantes de *B. burgdorferi*, como OspA o proteínas VlsE o péptidos sintéticos, que incluyen C6. Sin embargo, la elección de los antígenos resulta tedioso por la variabilidad antigénica entre las especies de *B. burgdorferi* s.l.
3. El cultivo de *Borrelia* spp. es la técnica de referencia, aunque no se utiliza para la rutina diagnóstica debido a las condiciones exigentes de crecimiento del microorganismo, a los componentes y concentraciones del medio y a la necesidad de controles de calidad. Tiene una baja sensibilidad por la poca cantidad de espiroquetas recuperables en las muestras. La sensibilidad reportada varía desde un 5% hasta un máximo de 88% en muestras de piel y solo un 40-44% para muestras de sangre. Rara vez se recuperan espiroquetas del tejido articular, LCR o cualquier otro tejido en la enfermedad tardía.
4. De acuerdo con la revisión bibliográfica los medios más empleados para el cultivo y aislamiento de *B. burgdorferi* s.l. son BSK-H completo y BSK-H modificado (gelatina, L-cisteína, L-glutamina, ditiotreitól-DTT). La temperatura óptima de incubación es de 33°C. Las condiciones de aislamiento varían según la especie. En todos los casos se debe hacer seguimiento del cultivo mediante microscopía de campo oscuro, una vez por semana, en un periodo de 10 a 12 semanas.

5. A partir de la revisión bibliográfica realizada se identificó una serie de técnicas no validadas para el diagnóstico de la BL, por presentar un rendimiento diagnóstico heterogéneo y dificultad en la estandarización. Estas pruebas se agrupan en aquellas que exploran respuestas inflamatorias y autoinmunes: (CXCL-13, CCL-19, Apolipoproteína B-100), son precisas, pero necesitan una mejor definición de corte y estandarización; pruebas que exploran la inmunidad celular [prueba de transformación de linfocitos, ELISpot -interferón- γ (IFN- γ), IFN-alfa, células CD57 + NK]: son pruebas dudosas, por falta de estudios que soporten su desempeño y pruebas microbiológicas directas que incluye xenodiagnóstico, microscopía y detección de proteínas de membrana OspA, difíciles de adoptar en la rutina normal de un laboratorio clínico.
6. Las técnicas de PCR se utilizan como una herramienta diagnóstica complementaria para BL, por su alta especificidad. Sin embargo, no están estandarizadas y presentan una sensibilidad variable, dependiendo de la etapa de la enfermedad y el tipo de muestra: 50-70% para biopsias cutáneas de EM y ACA y un 20-30% en LCR. Actualmente, el mejor uso de la PCR es para confirmar el diagnóstico clínico de la sospecha de artritis de Lyme (hasta > 90% de sensibilidad), en pacientes con manifestaciones clínicas y sin tratamiento antibiótico.
7. La falta de claridad respecto a los criterios de inclusión y de exclusión de pacientes (es decir, grupo control, pacientes con BL confirmada, pacientes con manifestaciones clínicas inespecíficas, con enfermedades víricas, autoinmunes, neurodegenerativas u otras enfermedades transmitidas por garrapatas, etc) suponen un sesgo para la validación de nuevas herramientas diagnósticas en la mayoría de publicaciones revisadas.

8. Es necesario desarrollar más investigaciones para estandarizar las técnicas no validadas más prometedoras y evaluar su rendimiento en el diagnóstico y seguimiento clínico, en términos de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, para evitar los resultados falsos negativos o falsos positivos, que repercuten directamente en el paciente, generando diagnósticos erróneos y tratamientos antimicrobianos sin respuesta clínica y con efectos adversos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I., & Wormser, G. P. (2005a). Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 484–509. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/cmr.18.3.484-509.2005>
- Alby, K., & Capraro, G. A. (2015). Alternatives to Serologic Testing for Diagnosis of Lyme Disease. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(4), 815–25. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.07.005>
- Ang, C. W., Notermans, D. W., Hommes, M., Simoons-Smit, A. M., & Herremans, T. (2011). Large differences between test strategies for the detection of anti-Borrelia antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five immunoblots. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(8), 1027–1032. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1157-6>
- Arvikar, S. L., & Steere, A. C. (2015). Diagnosis and Treatment of Lyme Arthritis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), 269–280. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.004>
- Aucott, J., Morrison, C., Munoz, B., Rowe, P. C., Schwarzwald, A., & West, S. K. (2009). Diagnostic challenges of early Lyme disease: Lessons from a community case series. *BMC Infectious Diseases*, 9(1), 79. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-79>
- Aucott, J. N., Soloski, M. J., Rebman, A. W., Crowder, L. A., Lahey, L. J., Wagner, C. A., ... Bechtold, K. T. (2016). CCL19 as a Chemokine Risk Factor for Posttreatment Lyme Disease Syndrome: a Prospective Clinical Cohort Study. *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(9), 757–766. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/cvi.00071-16>
- Baehr, V. von, Doebis, C., Volk, H.-D., & Baehr, R. von. (2012). The Lymphocyte Transformation Test for Borrelia Detects Active Lyme Borreliosis and Verifies Effective Antibiotic Treatment. *The Open Neurology Journal*, 6, 104–112. Retrieved from <https://doi.org/10.2174/1874205x01206010104>
- Barbour, A. G., & Benach, J. L. (2019). Discovery of the Lyme Disease Agent. *MBio*, 10(5), e02166-19. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/mbio.02166-19>
- Becker, I., Sokani S., Guzman, C., Ochoa, L. (2018). *Borrelia* spp. Asociadas con anfibios y reptiles: hospederos y distribución mundial, 01(01), 22–33.
- Best, S. J., Tschaep, M. I., & Wilson, K. M. (2019). Investigation of the performance of serological assays used for Lyme disease testing in Australia. *PLOS ONE*, 14(4), e0214402. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214402>
- Bhate, C., & Schwartz, R. A. (2011). Lyme disease Part I. Advances and perspectives. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64(4), 619–636. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.03.046>
- Bil-Lula, I., Matuszek, P., Pfeiffer, T., & Woźniak, M. (2015). Lyme Borreliosis - the Utility of Improved Real-Time PCR Assay in Detection of *Borrelia burgdorferi* Infections. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24(4), 663–670. Retrieved from <https://doi.org/10.17219/acem/28625>
- Borchers, A. T., Keen, C. L., Huntley, A. C., & Gershwin, M. E. (2015a). Lyme disease: A rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *Journal of Autoimmunity*, 57, 82–115. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.09.004>

- Boyle, W. K., Hall, L. S., Armstrong, A. A., Dulebohn, D. P., Samuels, D. S., Gherardini, F. C., & Bourret, T. J. (2020). Establishment of an in vitro RNA polymerase transcription system: a new tool to study transcriptional activation in *Borrelia burgdorferi*. *Scientific Reports*, 10(1), 8246. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65104-y>
- Bonet Alavés E, Guerrero Espejo A, Cuenca Torres M, Gimeno Vilarrasa (2016). Incidence of Lyme disease in Spain. *F.Med Clin (Barc)*. 15;147(2):88-9.
- Branda, J. A., Aguero-Rosenfeld, M. E., Ferraro, M. J., Johnson, B. J. B., Wormser, G. P., & Steere, A. C. (2010). 2-Tiered Antibody Testing for Early and Late Lyme Disease Using Only an Immunoglobulin G Blot with the Addition of a VlsE Band as the Second-Tier Test. *Clinical Infectious Diseases*, 50(1), 20–26. Retrieved from <https://doi.org/10.1086/648674>
- Branda, J. A., Linskey, K., Kim, Y. A., Steere, A. C., & Ferraro, M. J. (2011). Two-Tiered Antibody Testing for Lyme Disease With Use of 2 Enzyme Immunoassays, a Whole-Cell Sonicate Enzyme Immunoassay Followed by a VlsE C6 Peptide Enzyme Immunoassay. *Clinical Infectious Diseases*, 53(6), 541–547. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/cid/cir464>
- Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G., Birtles, R. J., Bjoërsdorff, A., Blanco, J. R., ... Wilske, B. (2004). Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(12), 1108–1132. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01019.x>
- Callister, S. M., Jobe, D. A., Stuparic-Stancic, A., Miyamasu, M., Boyle, J., Dattwyler, R. J., & Arnaboldi, P. M. (2016). Detection of IFN- γ Secretion by T Cells Collected Before and After Successful Treatment of Early Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 62(10), 1235–1241. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/cid/ciw112>
- Casjens, S. R., Gilcrease, E. B., Vujadinovic, M., Mongodin, E. F., Luft, B. J., Schutzer, S. E., ... Qiu, W.-G. (2017). Plasmid diversity and phylogenetic consistency in the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *BMC Genomics*, 18(1), 165. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3553-5>
- (CDC), C. for D. C. and P. (2013). Three sudden cardiac deaths associated with Lyme carditis - United States, November 2012-July 2013. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62(49), 993–6.
- Cerar, T., Ružić-Sabljić, E., Glinšek, U., Zore, A., & Strle, F. (2008). Comparison of PCR methods and culture for the detection of *Borrelia* spp. in patients with erythema migrans. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(7), 653–658. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02013.x>
- Cinco M, Murgia R. (2006) Evaluation of the C6 enzyme-linked immunoadsorbent assay for the serodiagnosis of Lyme borreliosis in north-eastern Italy. *New Microbiol*.29:139-41.
- Chandra, A., Wormser, G. P., Marques, A. R., Latov, N., & Alaedini, A. (2011). Anti-Borrelia burgdorferi Antibody Profile in Post-Lyme Disease Syndrome. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(5), 767–771. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/cvi.00002-11>
- Coipan, E. C., Jahfari, S., Fonville, M., Oei, G. A., Spanjaard, L., Takumi, K., ... Sprong, H. (2016). Imbalanced presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. multilocus sequence types in clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 42, 66–76. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.019>
- Comerford, I., Harata-Lee, Y., Bunting, M. D., Gregor, C., Kara, E. E., & McColl, S. R. (2013). A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24(3), 269–283. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.03.001>

- Cook, M. J., & Puri, B. K. (2016). Commercial test kits for detection of Lyme borreliosis: a meta-analysis of test accuracy. *International Journal of General Medicine*, Volume 9, 427–440. Retrieved from <https://doi.org/10.2147/ijgm.s122313>
- Crowley, J. T., Drouin, E. E., Pianta, A., Strle, K., Wang, Q., Costello, C. E., & Steere, A. C. (2015). A Highly Expressed Human Protein, Apolipoprotein B-100, Serves as an Autoantigen in a Subgroup of Patients With Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 212(11), 1841–1850. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv310>
- Crowley, J. T., Drouin, E. E., Wang, Q., McHugh, G., & Costello, C. E. (2014). Apolipoprotein B Is a T target of T and B Cell Responses in a Subgroup of Patients with Lyme Disease. *ACR/ARHP Annual Meeting*, 984.
- DeLong, A., Hsu, M., & Kotsoris, H. (2019). Estimation of cumulative number of post-treatment Lyme disease cases in the US, 2016 and 2020. *BMC Public Health*, 19(1), 352. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s12889-019-6681-9>
- Dessau, R. B. (2013). Diagnostic accuracy and comparison of two assays for *Borrelia*-specific IgG and IgM antibodies: proposals for statistical evaluation methods, cut-off values and standardization. *Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt_12), 1835–1844. Retrieved from <https://doi.org/10.1099/jmm.0.061275-0>
- Eckman, E. A., Clausen, D. M., Herdt, A. R., Pacheco-Quinto, J., & Halperin, J. J. (2020). Specificity and Diagnostic Utility of Cerebrospinal Fluid CXCL13 in Lyme Neuroborreliosis. *Clinical Infectious Diseases*. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa335>
- Eldin, C, Raffetin, A., Bouiller, K., Hansmann, Y., Roblot, F., Raoult, D., & Parola, P. (2018). Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(2), 121–132. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.11.011>
- Eldin, Carole, Jaulhac, B., Mediannikov, O., Arzouni, J.-P., & Raoult, D. (2019). Values of diagnostic tests for the various species of spirochetes. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(2), 102–111. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.01.009>
- Embers, M. E., Barthold, S. W., Borda, J. T., Bowers, L., Doyle, L., Hodzic, E., ... Philipp, M. T. (2012). Persistence of *Borrelia burgdorferi* in Rhesus Macaques following Antibiotic Treatment of Disseminated Infection. *PLoS ONE*, 7(1), e29914. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029914>
- Embers, M. E., Hasenkampf, N. R., Jacobs, M. B., Tardo, A. C., Doyle-Meyers, L. A., Philipp, M. T., & Hodzic, E. (2017). Variable manifestations, diverse seroreactivity and post-treatment persistence in non-human primates exposed to *Borrelia burgdorferi* by tick feeding. *PLOS ONE*, 12(12), e0189071. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189071>
- Enkelmann, J., Böhmer, M., Fingerle, V., Sifczyk, C., Werber, D., Littmann, M., ... Wilking, H. (2018). Incidence of notified Lyme borreliosis in Germany, 2013–2017. *Scientific Reports*, 8(1), 14976. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33136-0>
- Escudero, R., Barral, M., Pérez, A., Vitutia, M. M., García-Pérez, A. L., Jiménez, S., ... Anda, P. (2000). Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4026–33.
- Escudero-Nieto, R., & Guerrero-Espejo, A. (2005). Enfermedades producidas por *Borrelia*. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 23(4), 232–240.

- Eshoo, M. W., Schutzer, S. E., Crowder, C. D., Carolan, H. E., & Ecker, D. J. (2014). Achieving molecular diagnostics for Lyme disease. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 13(8), 875–883. Retrieved from <https://doi.org/10.1586/14737159.2013.850418>
- Figoni, J., Chirouze, C., Hansmann, Y., Lemogne, C., Hentgen, V., Saunier, A., ... societies, endorsed by scientific. (2019). Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French Scientific Societies (I): prevention, epidemiology, diagnosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(5), 318–334. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.04.381>
- Garza, J. A. C. la, Cruz-Valadez, E. D. la, Ocampo-Candiani, J., & Welsh, O. (2019). Clinical spectrum of Lyme disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(2), 201–208. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3417-1>
- Gern, L. (2009). Current Problems in Dermatology. *Current Problems in Dermatology*, 37, 18–30. Retrieved from <https://doi.org/10.1159/000213068>
- González, I. R. (2013). Actualización acerca de *Borrelia burgdorferi* sensu lato y enfermedad de Lyme. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 65(2), 149–165.
- Gorkom, T., Voet, W., Sankatsing, S. U. C., Nijhuis, C. D. M., Haak, E., Kremer, K., & Thijsen, S. F. T. (2020). Prospective comparison of two enzyme-linked immunosorbent spot assays for the diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Clinical & Experimental Immunology*, 199(3), 337–356. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/cei.13393>
- M Gómez-Eguílaz, J Gómez-Cerquera, L Calvo-Pérez , J A Oteo. (2016). Neuroborreliosis: A Single-Hospital Series of 7 Cases. *Neurologia*. 31(2):137-9. doi: 10.1016/j.nrl.2014.03.008.
- Gudowska-Sawczuk, M., & Mroczko, B. (2020). Chemokine Ligand 13 (CXCL13) in Neuroborreliosis and Neurosyphilis as Selected Spirochetal Neurological Diseases: A Review of Its Diagnostic Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2927. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/ijms21082927>
- Hodzic, E., Imai, D., Feng, S., & Barthold, S. W. (2014). Resurgence of Persisting Non-Cultivable *Borrelia burgdorferi* following Antibiotic Treatment in Mice. *PLoS ONE*, 9(1), e86907. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086907>
- Hofmann, H., Fingerle, V., Hunfeld, K.-P., Huppertz, H.-I., Krause, A., Rauer, S., & Ruf, B. (2017). Cutaneous Lyme borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society. *GMS German Medical Science*, 15, Doc14. Retrieved from <https://doi.org/10.3205/000255>
- Hsieh, Y.-F., Liu, H.-W., Hsu, T.-C., Wei, J. C.-C., Shih, C.-M., Krause, P. J., & Tsay, G. J. (2007). Serum Reactivity against *Borrelia burgdorferi* OspA in Patients with Rheumatoid Arthritis ▽. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(11), 1437–1441. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/cvi.00151-07>
- Huppertz, H. I., Bartmann, P., Heininger, U., Fingerle, V., Kinet, M., Klein, R., ... Nentwich, H. J. (2012). Rational diagnostic strategies for Lyme borreliosis in children and adolescents: recommendations by the Committee for Infectious Diseases and Vaccinations of the German Academy for Pediatrics and Adolescent Health. *European Journal of Pediatrics*, 171(11), 1619–1624. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00431-012-1779-4>
- Jabbari, N., Glusman, G., Joesch-Cohen, L. M., Reddy, P. J., Moritz, R. L., Hood, L., & Lausted, C. G. (2018). Whole genome sequence and comparative analysis of *Borrelia burgdorferi* MM1. *PLOS ONE*, 13(6), e0198135. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198135>

- Jacek, E., Fallon, B. A., Chandra, A., Crow, M. K., Wormser, G. P., & Alaedini, A. (2013). Increased IFN α activity and differential antibody response in patients with a history of Lyme disease and persistent cognitive deficits. *Journal of Neuroimmunology*, 255(1–2), 85–91. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.10.011>
- Jin, C., Roen, D. R., Lehmann, P. V., & Kellermann, G. H. (2013). An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to *Borrelia burgdorferi*. *Cells*, 2(3), 607–620. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/cells2030607>
- John, T. M., & Taege, A. J. (2019). Appropriate laboratory testing in Lyme disease. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 86(11), 751–759. Retrieved from <https://doi.org/10.3949/ccjm.86a.19029>
- Jungnick, S., Margos, G., Rieger, M., Dzaferovic, E., Bent, S. J., Overzier, E., ... Fingerle, V. (2015). *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii*: Population structure and differential pathogenicity. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(7), 673–681. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.08.017>
- Knudtzen, F. C., Nilsson, A. C., Hovius, J. W., & Skarphedinsson, S. (2020). The predictive value of CXCL13 in suspected Lyme neuroborreliosis: a retrospective cross-sectional study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1–10. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03861-4>
- Kodym, P., Kurzová, Z., Berenová, D., Pícha, D., Smíšková, D., Moravcová, L., & Malý, M. (2018). Serological Diagnostics of Lyme Borreliosis: Comparison of Universal and *Borrelia* Species-Specific Tests Based on Whole-Cell and Recombinant Antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(11), e00601-18. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/jcm.00601-18>
- Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M. B., Chavakis, T., ... Chmelař, J. (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*, 128, 58–68. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.005>
- Kovarik, P., Castiglia, V., Ivin, M., & Ebner, F. (2016). Type I Interferons in Bacterial Infections: A Balancing Act. *Frontiers in Immunology*, 7, 652. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00652>
- Krishnan, V. V., Selvan, S. R., Parameswaran, N., Venkateswaran, N., Luciw, P. A., & Venkateswaran, K. S. (2018). Proteomic profiles by multiplex microsphere suspension array. *Journal of Immunological Methods*, 461, 1–14. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.07.002>
- Krupka, M., Raska, M., Belakova, J., Horynova, M., Novotny, R., & Weigl, E. (2007). Biological aspects of lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomedical Papers*, 151(2), 175–186. Retrieved from <https://doi.org/10.5507/bp.2007.032>
- Lagier, J.-C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 208–236. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/cmr.00110-14>
- Ledue, T. B., Collins, M. F., Young, J., & Schriefer, M. E. (2008). Evaluation of the Recombinant VlsE-Based Liaison Chemiluminescence Immunoassay for Detection of *Borrelia burgdorferi* and Diagnosis of Lyme Disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(12), 1796–1804. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/cvi.00195-08>
- Leeflang, M. M. G., Ang, C. W., Berkhout, J., Bijlmer, H. A., Bortel, W. V., Brandenburg, A. H., ... Sprong, H. (2016). The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe:

- a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 140. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1468-4>
- Lintner, H., Hochgatterer-Rechberger, P., Pischinger, B., Seier, J., Vollmann, P., Haushofer, A., ... Topakian, R. (2020). Sensitivity and specificity of cerebrospinal fluid CXCL13 for diagnosing Lyme neuroborreliosis - a study on 1410 patients and review of the literature. *Journal of the Neurological Sciences*, 414, 116843. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116843>
- Little, S. E., Heise, S. R., Blagburn, B. L., Callister, S. M., & Mead, P. S. (2010). Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. *Trends in Parasitology*, 26(4), 213–218. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.006>
- Lohr, B., Fingerle, V., Norris, D. E., & Hunfeld, K.-P. (2018). Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: Current state of the art and future perspectives. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 55(4), 1–27. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1450353>
- MacDonald, A. B. (2013). *Borrelia burgdorferi* tissue morphologies and imaging methodologies. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32(8), 1077–1082. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1853-5>
- Magni, R., Espina, B. H., Shah, K., Lepene, B., Mayuga, C., Douglas, T. A., ... Luchini, A. (2015). Application of Nanotrap technology for high sensitivity measurement of urinary outer surface protein A carboxyl-terminus domain in early stage Lyme borreliosis. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 346. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0701-z>
- Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. Retrieved from <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mannelli, A., Bertolotti, L., Gern, L., & Gray, J. (2012). Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 837–861. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00312.x>
- Markowicz, M., & Stanek, G. (2018). Borrelial serology does not contribute to the diagnostic work-up of patients with nonspecific symptoms. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(1), 2–3. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.011>
- Marques, A R, Stock, F., & Gill, V. (2000). Evaluation of a new culture medium for *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4239–41.
- Marques, A., Telford, S. R., Turk, S.-P., Chung, E., Williams, C., Dardick, K., ... Hu, L. T. (2014). Xenodiagnosis to Detect *Borrelia burgdorferi* Infection: A First-in-Human Study. *Clinical Infectious Diseases*, 58(7), 937–945. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/cid/cit939>
- Marques, Adriana R. (2010). Lyme Disease: A Review, 10, 13–20. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11882-009-0077-3>
- Meléndez, M. E. G., Taylor, C. S., Alanís, J. C. S., & Candiani, J. O. (2014). Enfermedad de Lyme: actualizaciones. *Gaceta Médica de México*, 150, 84–95.
- Molins, C. R., Delorey, M. J., Replogle, A., Sexton, C., & Schrieffer, M. E. (2017). Evaluation of bioMérieux's Dissociated Vidas Lyme IgM II and IgG II as a First-Tier Diagnostic Assay for Lyme Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), 1698–1706. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/jcm.02407-16>

- Moore, A., Nelson, C., Molins, C., Mead, P., & Schriefer, M. (2016). Current Guidelines, Common Clinical Pitfalls, and Future Directions for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1169–1177. Retrieved from <https://doi.org/10.3201/eid2207.151694>
- Müllegger, R. R., & Glatz, M. (2008). Skin Manifestations of Lyme Borreliosis. *American Journal of Clinical Dermatology*, 9(6), 355–368. Retrieved from <https://doi.org/10.2165/0128071-200809060-00002>
- Nielsen, C. M., White, M. J., Goodier, M. R., & Riley, E. M. (2013). Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Frontiers in Immunology*, 4, 422. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00422>
- Nikolić, A., Boljević, D., Bojić, M., Veljković, S., Vuković, D., Paglietti, B., ... Rubino, S. (2020). Lyme Endocarditis as an Emerging Infectious Disease: A Review of the Literature. *Frontiers in Microbiology*, 11, 278. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00278>
- Ogden, N. H., Lindsay, L. R., Hanincová, K., Barker, I. K., Bigras-Poulin, M., Charron, D. F., ... Thompson, R. A. (2008). Role of Migratory Birds in Introduction and Range Expansion of Ixodes scapularis Ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6), 1780–1790. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/aem.01982-07>
- Ogrinc, K., Lusa, L., Lotrič-Furlan, S., Bogovič, P., Stupica, D., Cerar, T., ... Strle, F. (2016). Course and Outcome of Early European Lyme Neuroborreliosis (Bannwarth Syndrome): Clinical and Laboratory Findings. *Clinical Infectious Diseases*, 63(3), 346–353. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/cid/ciw299>
- Oteo, J. A., Backenson, P. B., Vitutia, M. del M., Moncó, J. C. G., Rodríguez, I., Escudero, R., & Anda, P. (1998). Use of the C3H/He Lyme disease mouse model for the recovery of a Spanish isolate of *Borrelia garinii* from erythema migrans lesions. *Research in Microbiology*, 149(1), 39–46. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(97\)83622-4](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(97)83622-4)
- Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R. R., Ramamoorthi, N., deSilva, A. M., ... Fikrig, E. (2004). TROSPA, an Ixodes scapularis Receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*, 119(4), 457–468. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.027>
- Palomar, A. M., Santibáñez, P., Mazuelas, D., Roncero, L., Santibáñez, S., Portillo, A., & Oteo, J. A. (2012). Role of Birds in Dispersal of Etiologic Agents of Tick-borne Zoonoses, Spain, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 18(7), 1188–1191. Retrieved from <https://doi.org/10.3201/eid1807.111777>
- Petrulionienė, A., Radzišauskienė, D., Ambrozaitis, A., Čaplinskas, S., Paulauskas, A., & Venalis, A. (2020). Epidemiology of Lyme Disease in a Highly Endemic European Zone. *Medicina*, 56(3), 115. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/medicina56030115>
- Petzke, M. M., Iyer, R., Love, A. C., Spieler, Z., Brooks, A., & Schwartz, I. (2016). *Borrelia burgdorferi* induces a type I interferon response during early stages of disseminated infection in mice. *BMC Microbiology*, 16(1), 29. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0644-4>
- Philipp, M. T., Wormser, G. P., Marques, A. R., Bittker, S., Martin, D. S., Nowakowski, J., & Dally, L. G. (2005). A Decline in C6 Antibody Titer Occurs in Successfully Treated Patients with Culture-Confirmed Early Localized or Early Disseminated Lyme Borreliosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(9), 1069–1074. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/cdli.12.9.1069-1074.2005>

- Pilz, G., Steger, R., Wipfler, P., Otto, F., Afazel, S., Haschke-Becher, E., ... Harrer, A. (2019). Beyond LNB: Real life data on occurrence and extent of CSF CXCL13 in neuroinflammatory diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 338, 577087. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.577087>
- Portillo, A., Santibáñez, S., & Oteo, J. A. (2014). Enfermedad de Lyme. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37–42.
- Portillo A, Chaparro E, Oteo JA, Jado I, Anda P, Escudero R. (2006). Evaluación de dos ensayos comerciales para el diagnóstico serológico de la borreliosis de Lyme. Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia 10-13 Mayo.
- Puri, B. K., Segal, D. R., & Monro, J. A. (2014). diagnostic use of the lymphocyte transformation test-memory lymphocyte immunostimulation assay in conforming active lyme borreliosis in clinically and serologically ambiguous cases, 7(12), 5890–589.
- Raffetin, A., Saunier, A., Bouiller, K., Caraux-Paz, P., Eldin, C., Gallien, S., ... Grillon, A. (2019). Unconventional diagnostic tests for Lyme borreliosis: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(1), 51–59. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.06.033>
- Robinson, M. L., Kobayashi, T., Higgins, Y., Calkins, H., & Melia, M. T. (2015). Lyme Carditis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), 255–268. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.003>
- Rogovsky, A. S., & Bankhead, T. (2013). Variable VlsE Is Critical for Host Reinfection by the Lyme Disease Spirochete. *PLoS ONE*, 8(4), e61226. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061226>
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., & Oliver, J. H. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(3), 123–128. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.04.002>
- Ružić-Sabljčić, E., & Cerar, T. (2016). Progress in the molecular diagnosis of Lyme disease. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(1), 1–12. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1246959>
- Ružić-Sabljčić, E., Lotrič-Furlan, S., Maraspin, V., Cimperman, J., Logar, M., Jurca, T., & Strle, F. (2006). Comparison of isolation rate of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in MKP and BSK-II medium. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 267–273. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.005>
- Ružić-Sabljčić, E., Maraspin, V., Cimperman, J., Strle, F., Lotrič-Furlan, S., Stupica, D., & Cerar, T. (2014). Comparison of isolation rate of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in two different culture media, MKP and BSK-H. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7), 636–641. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12457>
- Ružić-Sabljčić, E., Maraspin, V., Stupica, D., Rojko, T., Bogovič, P., Strle, F., & Cerar, T. (2017). Comparison of MKP and BSK-H media for the cultivation and isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *PLOS ONE*, 12(2), e0171622. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171622>
- Sapi, E., Pabbati, N., Datar, A., Davies, E. M., Rattelle, A., & Kuo, B. A. (2013). Improved Culture Conditions for the Growth and Detection of *Borrelia* from Human Serum. *International Journal of Medical Sciences*, 10(4), 362–376. Retrieved from <https://doi.org/10.7150/ijms.5698>
- Schmitz, J. L. (2020). Expanding Access to Biospecimens for Lyme Disease Test Development. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6). Retrieved from <https://doi.org/10.1128/jcm.00449-20>

- Schoen, R. T. (2020). Challenges in the Diagnosis and Treatment of Lyme Disease. *Current Rheumatology Reports*, 22(1), 3. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11926-019-0857-2>
- Schwaiger, M., Peter, O., & Cassinotti, P. (2001). Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(9), 461–469.
- Ścieszka, J., Dąbek, J., & Cieślik, P. (2015). Post-Lyme disease syndrome. *Reumatologia/Rheumatology*, 1, 46–48. Retrieved from <https://doi.org/10.5114/reum.2015.50557>
- Sillanpää, H., Lahdenne, P., Sarvas, H., Arnež, M., Steere, A., Peltomaa, M., & Seppälä, I. (2007). Immune responses to borrelial VlsE IR6 peptide variants. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(1), 45–52. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.09.001>
- Smismans, A., Goossens, V. J., Nulens, E., & Bruggeman, C. A. (2006). Comparison of five different immunoassays for the detection of *Borrelia burgdorferi* IgM and IgG antibodies. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(7), 648–655. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01448.x>
- Solís-Hernández, A., Rodríguez-Vivas, R. I., Esteve-Gassent, M. D., & Villegas-Pérez, S. L. (2016). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in synanthropic rodents in two rural communities of Yucatán, México. *Biomedica*, 36(1), 109–117. Retrieved from <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3139>
- Solomon, C. G., & Shapiro, E. D. (2014). Lyme Disease. *The New England Journal of Medicine*, 370(18), 1724–1731. Retrieved from <https://doi.org/10.1056/nejmcp1314325>
- Soloski, M. J., Crowder, L. A., Lahey, L. J., Wagner, C. A., Robinson, W. H., & Aucott, J. N. (2014). Serum Inflammatory Mediators as Markers of Human Lyme Disease Activity. *PLoS ONE*, 9(4), e93243. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093243>
- Stanek, G., Fingerle, V., Hunfeld, K. -P., Jaulhac, B., Kaiser, R., Krause, A., ... Gray, J. (2011). Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(1), 69–79. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03175.x>
- Stanek, Gerold, & Strle, F. (2018). Lyme borreliosis—from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 233–258. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/femsre/fux047>
- Stanek, Gerold, Wormser, G. P., Gray, J., & Strle, F. (2012). Lyme borreliosis, 379, 461–473. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60103-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60103-7)
- Steere, A. C., Strle, F., Wormser, G. P., Hu, L. T., Branda, J. A., Hovius, J. W. R., ... Mead, P. S. (2016). Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16090. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.90>
- Strle, K., Sulka, K. B., Pianta, A., Crowley, J. T., Arvikar, S. L., Anselmo, A., ... Steere, A. C. (2017). T H 17 Cytokine Responses in Lyme Disease Correlate with *Borrelia burgdorferi* Antibodies During Early Infection in Patients with Erythema Migrans and with Autoantibodies Late in the Illness in Patients with Antibiotic-Refractory Lyme Arthritis. *Clinical Infectious Diseases*, cix002. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/cid/cix002>
- Sulka, K. B., Strle, K., Crowley, J. T., Lochhead, R. B., Anthony, R., & Steere, A. C. (2018). Correlation of Lyme Disease–Associated IgG4 Autoantibodies With Synovial Pathology in Antibiotic-Refractory Lyme Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 70(11), 1835–1846. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/art.40566>

- Talagrand-Reboul, E., Raffetin, A., Zachary, P., Jaulhac, B., & Eldin, C. (2020). Immunoserological Diagnosis of Human Borrelioses: Current Knowledge and Perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 241. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00241>
- Tilly, K., Rosa, P. A., & Stewart, P. E. (2008). Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 217–234. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.013>
- Tulloch, J. S. P., Decraene, V., Christley, R. M., Radford, A. D., Warner, J. C., & Vivancos, R. (2019). Characteristics and patient pathways of Lyme disease patients: a retrospective analysis of hospital episode data in England and Wales (1998–2015). *BMC Public Health*, 19(1), 931. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7245-8>
- Veinović, G., Cerar, T., Strle, F., & Ružić-Sabljčić, E. (2014). Influence of MKP medium stored for prolonged periods on growth and morphology of *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *APMIS*, 122(3), 230–235. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/apm.12129>
- Waddell, L. A., Greig, J., Mascarenhas, M., Harding, S., Lindsay, R., & Ogden, N. (2016). The Accuracy of Diagnostic Tests for Lyme Disease in Humans, A Systematic Review and Meta-Analysis of North American Research. *PLOS ONE*, 11(12), e0168613. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168613>
- Wagner, J. N., Weis, S., Kubasta, C., Panholzer, J., & Oertzen, T. J. von. (2018). CXCL13 as a diagnostic marker of neuroborreliosis and other neuroinflammatory disorders in an unselected group of patients. *Journal of Neurology*, 265(1), 74–81. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8669-7>
- Wilking, H., & Stark, K. (2014). Trends in surveillance data of human Lyme borreliosis from six federal states in eastern Germany, 2009–2012. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(3), 219–224. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.10.010>
- Yang, J., Liu, Z., Guan, G., Che, R., Niu, Q., Li, Y. Yin, H. (2012). Evaluation of molecular methods for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in ticks. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(1), 80–83. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.016>
- Zannoli, S., Fantini, M., Semprini, S., Marchini, B., Ceccarelli, B., Sparacino, M., ... Sambri, V. (2020). Multicenter Evaluation of the C6 Lyme ELISA Kit for the Diagnosis of Lyme Disease. *Microorganisms*, 8(3), 457. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030457>